RECHERCHES SUR LE METABOLISME D'ACIDES AMINES PAR DES MOISISSURES

par

H. P. J. M. van WAESBERGHE S.J.

INTRODUCTION

Dans „The Annual Review of Biochemistry" (1936) nous lisons, page 539: „The unity in the biochemistry of all living organisms is nowadays so evident, that advances made in special chapters of this science will inevitably also influence our insight into the chemical behaviour of other groups of organisms" (KLUYVER) et page 585, nous lisons à propos *d'un organisme particulier:* „Scientific practice has revealed that within the species Aspergillus niger there may be found hundreds, probably even thousands of strains which, differing but slightly from each other in their morphological characters, show a high degree of variation in physiological and biochemical processes" (IWANOFF).

Ainsi on constate que les processus, se déroulant dans la levure, dans les bactéries et dans les moisissures, ressemblent d'une maniere frappante aux processus du métabolisme ayant leur siège dans la foie, les reins et les muscles. L'uniformité sous laquelle le métabolisme se présente à nous, pourrait être de nature à nous faire aboutir à une représentation très générale de ces processus, au regard de laquelle les différences entre les organismes ne signifieraient que des variations toutes légères.

Par contre, le microscope à ses limites extrêmes n'est pas à même d'indiquer des différences aussi nombreuses et aussi diver-

gentes que celles qu'on constate par voie biochimique, non seulement entre les différentes espèces et variétés, mais même entre les races particulières d'une même variété de moisissure.

Nous nous approcherions peut-être davantage de la vérité, si nous combinions ces deux constatations qui semblent se contredire, sous la forme d'un paradoxe: à mesure qu'on trouve de plus grandes différences dans le comportement d'un organisme, nous trouvons une correspondance plus grande entre le comportement de tous les organismes.

Dans ce paradoxe, nous croyons exprimer la situation très singulière dans laquelle la question du métabolisme se trouve actuellement. Les présentes recherches ont été inspirées par la considération des deux parties du paradoxe formulé. En raison de la facilité remarquable de passer en biochimie d'un groupe d'organismes à un autre, nous nous sommes laissés guider par des données obtenues par des agents les plus différents.

L'agent principal de nos recherches, c'est l'Aspergillus niger. Il peut être très utile de rechercher si une diastase agissant d'une manière déterminée dans les tissus du rein ne peut pas être amenée à se manifester d'une manière correspondante dans une culture de cette moisissure. Mais les conclusions auxquelles nous avons abouti dans le cas de l'Aspergillus, nous ne les généraliserons pas à priori. Aussi, avons-nous étudié des cultures du Fusarium, du Cylindrocarpon, de l'Ascochyta et du Mucor.

Mais — et c'est la seconde partie du paradoxe qui l'affirme — il n'est pas permis de fonder des conclusions générales sur une étude même de cinq moisissures. Selon IWANOFF, en effet, on n'a pas le droit d'appliquer sans évidence expérimentale un résultat, obtenu dans une souche d'une race, sur une autre souche de la même race. Aussi, n'allons-nous pas déduire de cette étude de cinq moisissures une synthèse générale de résultats; cette étude nous permettra uniquement de formuler une hypothèse qui servira à pousser plus loin l'étude d'une de ces moisissures. C'est donc bien des deux parties du paradoxe que nous empruntons l'orientation de notre étude.

Il reste encore un point à préciser.

Ce qui nous guidera dans cette étude, ce sont les travaux récents de H. A. KREBS (1933, 1935, 1937), effectués sur des tissus animaux qu'il tuait ou du moins abîmait pour en étudier les diastases.

Or, dans notre cas les tissus des moisissures sont déjà si simples qu'il n'est pas nécessaire de les tuer ou de les abîmer

pour être à même de faire ressortir l'action des diastases qu'ils contiennent. Peut-être suffira-t-il de faire varier les conditions physiologiques du milieu pour mettre à jour un trait caractéristique de quelques diastases.

Il est bien entendu que de l'observation des réactions biochimiques dans le mycélium vivant on ne peut conclure à la présence dans le tissu de telle ou telle enzyme bien définie. Cependant, en conservant la vie dans des êtres très simples comme les moisissures, on pourra passer des données, obtenues en vitro, aux expériences effectuées in vivo. Dans les études des enzymes on passe de la vie à la mort; dans notre représentation générale nous tâcherons de passer de la mort à la vie; et dans nos expériences nous visons en outre de passer de la vie simple à la vie plus compliquée.

CHAPITRE I

Aperçu historique

Depuis le commencement de ce siècle l'intérêt des physiologistes s'est porté de plus en plus sur la chimie du métabolisme des êtres vivants. Du point de vue de la physiologie végétale, l'Aspergillus a été le plus étudié. Tamyia et Morita ont publié en 1929 et 1930 une Bibliographie de l'Aspergillus depuis 1729. Le nombre des publications s'élevait déjà alors à plus de 2000 et, suivant Iwanoff, ce nombre a augmenté de 300 en 1931 et 1932. Mises à part celles qui ne traitent pas du métabolisme, nous nous trouverions encore devant une bibliographie tellement vaste que nous ne pourrions pas la parcourir. Mais le travail antérieur a perdu beaucoup de sa valeur depuis qu'on a appliqué la chimie des diastases (enzymes, ferments) au domaine de la physiologie végétale. Cette application ne date que de ces dernières dizaines d'années, et c'est surtout à partir de 1933, que nous trouvons les publications qui méritent à être retenues. Dans notre aperçu nous avons choisi la question des enzymes comme fil conducteur. Nous y avons ajouté quelques publications qui étudient le métabolisme dans la matière vivante et qui se relient historiquement à l'évolution des recherches sur les enzymes ou qui ont de l'importance pour se représenter l'action des désaminases et des désamidases dans le vivant (article 1).

La transformation ultérieure des produits du métabolisme ainsi engendrés sera traitée à l'article 2.

Article 1

Enzymes

Seules les enzymes de désamidation et de désamination sont connues. Dans nos propres recherches, il ne sera question que d'acides aminés simples; nous examinerons donc les seules publications qui traitent de l'action des enzymes sur quelques-uns de ces mêmes acides.

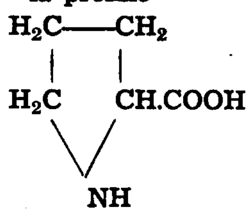
Plusieurs auteurs ont obtenu des préparations d'enzymes qui avaient une faible action sur la glutamine. Mais nous apprenons par la publication de H. A. KREBS (1935 b) qu'il existe une glutaminase très spécifique dont il a démontré l'existence dans le rein du cobaye et du lapin. Cette recherche avait été provoquée par le fait que, contrairement aux autres acides aminés, l'acide glutamique provoque une absorption d'oxygène (plus même que tout autre acide aminé naturel), mais sans formation d'ammoniac. Cependant, si on empoisonne le tissu par de l'anhydride arsénieux, comme avec les autres acides aminés on obtient une formation abondante d'ammoniac. On pouvait donc entrevoir l'hypothèse de la formation d'ammoniac comme stade intermédiaire, et sa disparition grâce à une réaction secondaire. Cela semble avoir été le cas: dans le tissu non-empoisonné on retrouve l'azote ammoniacal sous la forme d'azote amidé; il s'était donc formé de la glutamine aux dépens de l'acide glutamique. La synthèse de la glutamine à partir de l'acide glutamique et de l'ammoniac est liée au dynamisme cellulaire, parce qu'il doit y avoir apport d'énergie. Cette énergie est de l'énergie respiratoire dans le cas des tissus du rein. Ce dernier fait explique l'absorption supplémentaire d'oxygène. Plusieurs expériences de KREBS ont montré comme probable, que la glutaminase agit aussi bien dans l'hydrolyse que dans la synthèse de la glutamine. En outre, l'auteur a trouvé un moyen de distinguer la glutaminase de l'asparaginase. Ces deux enzymes sont étroitement liées, mais KREBS a trouvé une substance, qui entrave seulement l'action de la glutaminase, à savoir l'acide d (+) glutamique; on parvient donc à étudier la glutaminase séparément, quoiqu'elle n'ait jamais été isolée.

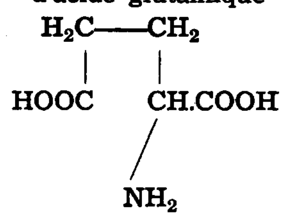
Dans une autre publication de la même année, WEIL-MALHERBE et KREBS (1935) ont trouvé un rapprochement inattendu entre l'acide glutamique et la proline. On savait déjà depuis quelques années que la proline est attaquée par une enzyme spéciale, la prolinase. VON SCHOENEBECK (1930) a été le premier à en démontrer l'existence. Il n'a pu cependant l'isoler, mais il en a beau-

coup augmenté la concentration dans des mélanges avec des di- et polypeptidases. La prolinase se rencontre dans les intestins, dans le pancréas et dans la levure, mais on ne l'a pas encore décelée dans les moisissures.

BERNHEIM et BERNHEIM (1935) confirment l'existence d'une enzyme spécifique de la proline, tout en suggérant qu'on ne peut guère s'attendre à l'existence d'une enzyme spécifique pour chaque acide aminé particulier. On connaît bien des expériences qui démontrent que le cas de la proline est exceptionnel. BERNHEIM et BERNHEIM (1934) ont notamment trouvé que la proline est le seul acide aminé connu, pour lequel la désamination et l'oxydation sont deux stades différents de dissociation. Cette anomalie a été complètement éclaircie par WEIL-MALHERBE et KREBS (1935). Leurs recherches ont notamment montré que, par oxydation

la proline passe à l'état d'acide glutamique





Cet acide glutamique peut être oxydé à un degré supérieur ou amidé, de sorte que le métabolisme de la proline peut être représenté comme suit:

$$\text{Proline} + O_2 \rightarrow \text{ac. glutamique} \begin{cases} + NH_3 \rightarrow \text{glutamine} \\ + 1/2\, O_2 \rightarrow \text{ac. } \alpha\text{-cétoglutarique} \\ \qquad\qquad + NH_3 \end{cases}$$

On doit signaler la guadinase comme le premier ferment de désamination dont on ait démontré expérimentalement l'existence dans les moisissures. (IWANOFF et AWETISSOWA, 1931). La formation de cette enzyme est activée par le sucre. Par un artifice très intéressant, les auteurs produisent des tissus de moisissure, exempts d'uréase, grâce à quoi ils sont à même d'obtenir les deux composants de la guanidine, l'urée et l'ammoniac, dans les proportions moléculaires caractéristiques de la guanidine.

L'asparaginase, déja citée plus haut, a souvent été étudiée depuis une trentaine d'années. Elle a été préparée la première

fois par LANG (1904) à partir d'organes de boeuf broyés. En une heure, il obtint une désamidation complète de l'asparagine. SHIBATA (1904) a recherché cette même enzyme dans une préparation de mycélium d'Aspergillus niger. Il n'a jamais obtenu de séparation de l'azote aminé et, avec l'asparagine, il n'obtient pas davantage d'action sur le radical amide, tandis qu'il put obtenir cette action sur l'acétamide, l'oxamide et la benzamide. C'est pourquoi il a cru être en présence d'une amidase qui, à titre d'exception seulement, n'agit pas sur l'asparagine, et il rattache à cette interprétation l'idée que la valeur nutritive de l'asparagine repose sur ses propriétés d'acide aminé et non pas sur sa fonction amide.

EFFRONT (1908) est parvenu pour la première fois à détacher également l'azote aminé et ceci, non par la préparation d'une enzyme mais par l'action d'une levure vivante. La levure décompose non seulement l'asparagine et la leucine mais aussi l'acide aspartique et l'acide glutamique. Entretemps, PRINGSHEIM (1908) avait essayé, mais sans succès, de réaliser au moyen d'une préparation d'enzyme les dissociations que n'avait pas réussies SHIBATA. Il a publié ce résultat négatif, après avoir pris connaissance des données d'EFFRONT, pour montrer clairement les erreurs à éviter dans les préparations de l'enzyme. SHIBATA et PRINGSHEIM avaient fait des préparations dans l'acétone, et c'est à cela qu'il faut, suivant PRINGSHEIM, attribuer la destruction de l'enzyme. Aussi FÜRTH et FRIEDMANN (1910) ont-ils supprimé toute extraction au moyen de solvents organiques. Les produits d'autolyse de la levure, qu'ils ont préparés, libèrent de l'asparagine une quantité d'ammoniac très considerable; cette quantité cependant reste toujours inférieure à ce qu'aurait pu libérer quantitativement la fonction amide de l'asparagine. Donc il n'a toujours pas été prouvé qu'une enzyme ait attaqué la fonction amine de ce même corps. En résumé, on a réalisé depuis LANG des perfectionnements de méthodes, mais l'essentiel de la question est resté sans solution.

BLANCHETIÈRE (1917) a été le premier à pouvoir faire apparaître expérimentalement le comportement différent du radical amine et du radical amide. Il travaille avec le Bacterium fluorescens. En milieu faiblement alcalin, le radical amide est détaché complètement au cours de la première semaine et, immédiatement après, le radical amine est attaqué. Mais ce deuxième stade dure cinq semaines de sorte que l'ensemble de la décomposition de l'asparagine dure six semaines. Cette longue durée est incontestablement un grand inconvénient pour se faire une représentation

claire de la séparation du radical amine; cependant le dispositif opératoire de BLANCHETIÈRE présente un grand avantage sur celui de ses devanciers et même sur celui qui a été utilisé dans des recherches effectuées beaucoup plus tard. En effet, le Bacterium fluorscens se développe dans l'asparagine seule comme milieu nutritif. On peut donc se dispenser d'ajouter d'autres substances pour le nourir, et ainsi observer isolément la décomposition de l'asparagine.

Ensuite, pendant dix ans, personne ne poursuit les recherches sur ces enzymes, mais pendant le même temps on met en lumière le rôle physiologique important de l'asparagine, notamment dans les plantes supérieures.

En 1927, VON EULER et MYRBÄCK doutent encore que l'asparaginase agisse uniquement sur l'asparagine. En effet, aucun auteur antérieur n'avait exclu la possibilité que la désamidase de l'asparagine pût agir également sur la fonction amide de quelques autres corps.

GROVER et CHIBNAL (1927) sont les premiers à constater nettement que la désamidation et la désamination sont deux processus distincts et ils veulent chercher à mieux connaître le passage de l'acide aspartique à l'asparagine. Ils travaillent avec des racines d'orge. Jusque-là, on n'avait suivi l'action de l'asparaginase que par des déterminations de l'ammoniac engendré comme produit de dissociation. La formation de l'acide aspartique restait encore une hypothèse. Ces auteurs étudient le phénomène par titrométrie, et les valeurs trouvées concordent avec les valeurs calculées théoriquement pour l'acide aspartique.

Mais ils croient que l'asparaginase n'est pas une enzyme exceptionnelle parce que l'érepsine agit également sur l'asparagine. Au contraire, d'après la nature reconnue complexe de l'érepsine, cet argument n'est pas valable. Par ailleurs, l'année suivante deux publications voient simultanément le jour, celle de BACH et celle de GEDDES et HUNTER, qui démontrent que l'asparaginase est spécifique pour la désamidation de l'asparagine, les deux publications ayant pour objet l'Aspergillus. GEDDES et HUNTER constatent que leur préparation, extraite à l'eau froide, est rendue inactive par la chaleur, l'alcool et l'acétone. Après une purification plus poussée, par adsorption, l'azote amidé est attaqué vivement tandis que l'azote aminé reste inattaqué. Les auteurs constatent une faible action sur la glutamine et ils en tirent la conclusion que l'action de l'enzyme appelée „asparaginase" est limitée au radical amide de l'asparagine. Donc ces recherches ont confirmé l'existence d'une asparaginase spécifique.

La préparation de BACH, comme toutes les précédentes, est sans influence sur la fonction amino-acide proprement dite. En 1930 SCHMALFUSS et MOTHES comparent d'une manière détaillée leurs résultats avec ceux de BACH. En principe, ils peuvent confirmer entièrement ses résultats, seules les limites de l'activité sont un peu différentes. GEDDES et HUNTER, BACH, SCHMALFUSS et MOTHES aboutissent donc unanimement au fait que l'Aspergillus dispose d'une enzyme dont l'action se manifeste spécifiquement par l'hydrolyse du radical amide de l'asparagine, mais on tâtonne encore sur la détermination des circonstances de cette action.

SCHMALFUSS et MOTHES se sont efforcés d'expliquer la dissociation de la fonction amine *in vivo* par des données empruntées à des préparations d'enzyme; mais il y a là des difficultés sérieuses. Le radical amide est dissocié activement *in vivo* quel que soit le pH, tandis que *in vitro* la décomposition est liée à un optimum très net qui se manifeste à pH = 7,8. L'explication tentée page 151: „es besteht berechtigte Vermutung dasz diese Desamidierung des Asparagins bei saurer Reaktion nicht identisch ist mit der Desamidierung bei hohem pH" ne paraît pas satisfaisante.

La préparation d'enzymes donne encore moins d'éclaircissements lorsqu'il s'agit de l'amino-azote de l'asparagine. Alors que *in vivo* le radical amine n'est attaqué qu'en milieu acide, il n'y a de décomposition quelconque *in vitro*, ni à pH élevé, ni à pH bas, et les auteurs notent simplement (page 140) „dasz der Amino-N des Asparagins durch ein Ferment nicht angegriffen wird". Ils ne sont donc pas parvenus à reconstituer dans la moisissure vivante, les données des préparations.

L'avantage de la préparation de SCHMALFUSS et MOTHES est son action énergique sur le radical amide; son désavantage, une pureté déficiente. La préparation de GEDDES et HUNTER est pure mais beaucoup plus faible. Or, GRASSMANN et MAYR (1933) ont réalisé une préparation de levure dont la purification est très poussée et qui, en même temps, est très active. En se fondant sur une dizaine de critères, ils apportent une distinction nette entre l'asparaginase et les di- et polypeptidases. Même lorsque la chaîne carbonique de l'asparagine est reliée sous forme de peptide à une autre chaîne, comme dans l'asparagine-monoglycine ou dans l'asparagyldialanine, il ne s'ensuit pas que l'asparaginase entre en action; ce qui démontre très clairement que celle-ci n'est pas une peptidase, mais tout au plus une amidase qui agit uniquement sur un radical libre $CONH_2$. En outre, l'action de cette amidase est limitée à une seule amide bien

déterminée: tous les radicaux amides n'ayant pas la même configuration que celle de la l-α-asparagine, résistent à l'action de cette enzyme purifiée. Lorsqu'au radical amine de l'asparagine on substitue un radical acétyle, la fonction amide résiste à toute attaque. Il en est de même lorsque le radical carboxyle libre est méthylé ou lorsqu'on expose à l'action de l'asparaginase les quatre isomères de l'α-hydroxy-asparagine et de la β-hydroxy-asparagine. La β-asparagine elle aussi résiste à toute attaque de l'asparaginase.

Cet examen démontre donc définitivement l'existence d'une asparaginase qui est spécifiée par son action sur la seule asparagine naturelle.

Les recherches de GRASSMANN et MAYR donnent les renseignements les plus complets au sujet de la désamidation de l'asparagine. Bien qu'ils n'aient travaillé qu'avec un seul agent — la levure — leur étude a été poussée tellement à fond qu'il nous a paru inutile de reproduire leurs expériences avec l'agent que nous avions choisi, l'Aspergillus.

Par contre, la question de la désamination se présente d'une façon différente. Les publications citées jusqu'à présent tantôt mentionnent une désamination *in vivo,* tantôt n'en mentionnent pas, mais elles sont unanimes à constater une résistance du radical aminé *in vitro.* A ce sujet des résultats très remarquables ont été publiés récemment; ils se répartissent en deux groupes différents:

1° — Les études sur l'aspartase: WOOLF (1929), VIRTANEN et TARNANEN (1932), JACOBSOHN, TAPADINHAS, PEREIRA (1935);

2° — Les études sur la désaminase: H. A. KREBS (1933a, 1933b, 1935a et 1935b).

Nous ne nous préoccuperons pas de rechercher comment on pourrait faire concorder les résultats de ces recherches, mais nous faisons simplement remarquer que les agents utilisés dans ces deux groupes d'études sont très différents. KREBS travaille avec des coupes de tissus animaux, tandis que les autres travaillent avec des bactéries ou des pois en germination, ou font circuler du sang dans du foie de chien.

La dénomination „aspartase" est due à WOOLF et elle désigne une enzyme qui affectue le passage de l'acide fumarique à l'acide aspartique. VIRTANEN et TARNANEN appuient surtout sur le fait que cette enzyme n'agit que dans ce seul cas particulier; au contraire, si dans ces corps le radical carboxyle ou l'hydrogène est remplacé par un autre radical, il n'y a plus d'action de l'aspartase. Les auteurs croient même que l'asparagine ne peut

être attaquée par l'aspartase qu'en passant par l'acide aspartique.

Enfin, Jacobsohn, Tapadinhas et Pereira réalisent une transformation *in vivo* de fumarate d'ammonium en acide aspartique. La conclusion commune de ces travaux sur l'aspartase est l'opinion que l'acide aspartique est désaminé par libération du radical amine et d'hydrogène, avec formation d'une double liaison.

Woolf et Virtanen insistent en outre sur la réversibilité de la réaction; ce trait présente une grande importance du point de vue physiologique, parce que dans ce cas la réaction étudiée par eux contribuerait à nous faire mieux comprendre la *synthèse* des acides aminés qui, jusqu'à présent, est restée assez énigmatique.

En attendant, on doit faire remarquer que cette interprétation de la transformation des corps aminés n'est pas la plus courante; jusqu'à un certain point elle est même en contradiction avec deux autres opinions suivant lesquelles les amino-acides se forment à partir d'hydroxacides ou de céto-acides.

Si un acide aminé passe à un hydroxacide, la désamination présente le caractère d'une hydrolyse, tandis que dans le passage d'un amino-acide à un céto-acide, la désamination se présente comme un processus d'oxydation.

Neubauer (1909) fut le premier à fournir un argument en faveur de l'opinion que la désamination est une oxydation et non pas une hydrolyse: lorsque des animaux sont nourris d'acides aminés dans lesquels on a introduit un radical phényle, on trouve dans l'urine les céto-acides qui correspondent à ces amino-acides. Les céto-acides correspondant aux amino-acides naturels n'ont pas pu être isolés, parce qu'on peut croire que s'ils se formaient, leur dissociation se produirait immédiatement.

Knoop (1925) a démontré ensuite que la synthèse des amino-acides a son point de départ non pas dans les hydroxacides, mais dans les céto-acides. Mais comme il y avait toujours des hydroxacides à côté des céto-acides, il n'était pas exclu qu'il pût y avoir avec la transformation par oxydation de l'amino-acide en céto-acide, une hydrolyse transformant l'amino-acide en hydroxacide. Le problème en était là lorsque Krebs s'y est attaqué; il a démontré par trois voies différentes que la désamination des amino-acides a lieu, avec les agents dont il s'est servi, par oxydation et *exclusivement* par oxydation.

Nous nous bornons à indiquer la première et la troisième démonstration de Krebs, qui aboutissent à un résultat certain; nous omettrons la seconde qui d'après les expériences de Bern-

HEIM et BERNHEIM (1934, 1935) et même d'après des expériences subséquentes de KREBS (1935) ne paraît pas entièrement probante.

Première démonstration de KREBS (1933a):

Dans un milieu contenant de l'oxygène il se forme à partir des amino-acides, beaucoup d'ammoniac et il ne s'en forme pas dans un milieu exempt d'oxygène. Du fait que la désamination est liée à la présence et à la consommation de l'oxygène on conclut que la voie par oxydation est la voie *unique* pour passer à une chaîne carbonique exempte d'azote.

La troisième démonstration de KREBS (1933a) va plus loin; elle prouve non seulement l'entrée en action de l'oxygène, mais encore la formation de céto-acides comme l'exige la formule:

$$R.CHNH_2COOH + O \rightarrow R.CO.COOH + NH_3$$

Les céto-acides n'avaient encore jamais pu être isolés à partir des α-amino acides aliphatiques. Pour atteindre ce but, on devra réaliser simultanément les conditions qui provoquent la formation d'un céto-acide et celles qui empêchent sa décomposition ultérieure. KREBS a atteint ce résultat par des dispositifs opératoires différents:

a) A partir de l'alanine, par empoisonnement du tissu à l'aide d'acide cyanhydrique et d'anhydride arsénieux, il est parvenu à isoler l'acide pyrotartrique qu'il a pu identifier comme hydrazone;

b) On détruit la structure cellulaire par un moyen mécanique; on empêche ainsi que les céto-acides disparaissent dans une réaction ultérieure; on obtient à la fois de l'oxygène, de l'ammoniac et des céto-acides dans les proportions 1 : 2 : 2 exigées par l'équation;

c) Dans de nombreux cas, la désamination a lieu — contrairement à ce qui se passe pour l'alanine — beaucoup plus rapidement que la dissociation du céto-acide; il n'est pas nécessaire de recourir alors à l'empoisonnement ni à la destruction de la structure cellulaire, car les céto-acides diffusent spontanément des coupes de tissus dans le liquide environnant.

C'est dans ce liquide que KREBS réussit l'isolation et l'identification des céto-acides qui correspondent aux acides aminés utilisés.

On peut faire à cet article de KREBS le reproche que ses exemples sont empruntés à des amino-acides qui ne se présentent pas trop fréquemment, tels que l'alanine, la leucine, l'isoleucine, l'acide aminobutyrique etc.; il y manque notamment les acides aminodicarboniques, si importants du point de vue

physiologique. Cette lacune a été comblée par un article du même auteur (1933b) dans lequel il annonce l'obtention des mêmes résultats pour l'acide aspartique et l'acide glutamique.

Le tissu de rein du rat, employé comme agent dans le premier article (1933a), s'est montré moins approprié pour ces expériences ultérieures (1933b); mais on a obtenu de bons résultats avec les reins de lapins, de cobayes et de chiens. Les vitesses de formation et de dissociation de l'acide oxalo-acétique ou de l'acide cétoglutarique sont telles que le céto-acide formé disparaît rapidement, de sorte qu'un empoisonnement par l'arsénic est nécessaire pour empêcher cette disparition.

Dans le premier article (1933a) l'auteur s'était heurté à un phénomène très étrange: la plupart des acides aminés non naturels se dissocient beaucoup plus rapidement — parfois 25 fois plus rapidement — que les acides naturels. Dans une publication subséquente KREBS (1395a) a donné à ce sujet des indications plus précises. Bien qu'il n'eût pas isolé l'enzyme appelée par lui „désaminase", tout semblait indiquer que la dissociation par oxydation des amino-acides tant lévogyres que dextrogyres est de nature enzymatique. Mais l'auteur a constaté qu'il y avait dans ces deux cas, deux „systèmes fermentatifs" présentant des différences notables.

C'est ainsi que le système par lequel sont désaminés les amino-acides naturels, est détruit par dessication du tissu, ne peut pas être extrait et est paralysé par les narcotiques. Par contre, le système par lequel sont désaminés les amino-acides non naturels résiste à la dessication, est soluble dans l'eau, est actif dans les extraits et n'est pas paralysé par les narcotiques. Ces faits prouvent l'existence de deux désaminases distinctes pour les acides aminés: une l-désaminase et une d-désaminase. L'article renferme en outre une représentation plutôt hypothétique du mode d'action des deux systèmes et de leurs relations. Pour les données sur lesquelles KREBS fond son hypothèse, nous renvoyons à son travail original; nous n'en résumons ici que l'aspect général. La différence entre la l-désaminase et la d-désaminase n'est peut-être qu'une simple différence de structure; elles peuvent avoir des composants communs, de sorte qu'on ait:

$$\text{l-désaminase} = \text{d-désaminase} + \text{co-enzyme}.$$

Ce qui l'indique, c'est qu'on ne peut obtenir la d-enzyme qu'aux dépens de tissus contenants la l-enzyme; par contre, il est possible d'extraire la l-enzyme du système contenant la d-enzyme. Les deux systèmes d'enzymes ont en commun avec les oxyda-

tions biologiques qu'une activation de l'oxygène est nécessaire à leur action [1]).

Seule l'action de la l-désaminase ressemble entièrement aux oxydations biologiques, parce qu'elle aussi est invariablement liée à la conservation de la structure cellulaire; cette action ne dépend pas de la solubilité ou de l'insolubilité de la l-désaminase; en effet, après broyage des tissus et séparation de l'extrait, le résidu et l'extrait sont l'un et l'autre inactifs. Cependant, cette ressemblance avec ce qu'on connaît des oxydations cellulaires ne permet pas de conclure à une identité. Les désaminases forment un système d'oxydation particulier qui, dans les tissus, peut être distingué des autres systèmes d'oxydation par l'anhydride arsénieux; car ce dernier n'entrave pas la désamination, mais empêche l'oxydation ultérieure du céto-acide formé. On pourrait en conclure que cette oxydation ultérieure est due à l'action de déshydrogénases. En effet, les expériences de BANGA, SCHNEIDER et SZENT-GYÖRGYI (1931) indiquent que l'anhydride arsénieux arrêterait l'action des seules déshydrogénases.

Quelles sont ces déshydrogénases? Pour expliquer l'oxydation ultérieure du céto-acide formé, ne devrait-on pas faire plutôt appel à une enzyme bien définie, la carboxylase? Ce serait là une généralisation illicite. Bien qu'il soit reconnu que cette enzyme agit sur les céto-acides dans la levure, ces mêmes céto-acides se dissocient d'une manière toute différente dans les bactéries et les tissus animaux (voir article 2).

Etant donné que dans notre cas on ne peut faire appel à aucune enzyme identifiée, nous supposons simplement:

1° qu'il existe des enzymes agissant sur la chaîne carbonique des acides aminés,

2° en nous appuyant sur le critérium de BANGA c.s. (1931), nous les désignons du terme général „déshydrogénases".

En résumé, nous pouvons dire que l'asparaginase (GRASSMANN et MAYR) et la glutaminase (KREBS 1935b) sont identifiées comme hydrolyseurs spécifiques du radical amide, attaché respectivement à l'acide aspartique et à l'acide glutamique. On n'a pas examiné s'il existe encore d'autres désamidases, correspondant chacune à un seul acide amidé.

Quant aux désaminases, c'est dans les articles cités de H. A. KREBS, qu'on trouvera presque tout ce qui est connu à leur sujet.

Peut-être pourrait-il être question, pour les désaminases comme pour les désamidases, d'une action sur un seul acide aminé.

---

[1]) Cela s'applique également à la désaminase des d-amino-acides (qui agit donc dans les tissus autrement que dans un extrait).

Cependant cette action spécifique cadrerait moins avec ce que l'on connaît déjà des désaminases. Le point important qui fait paraître les désaminases comme étroitement apparentées entre elles, c'est leur action oxydante; au contraire, l'action des désamidases est une hydrolyse.

Les désaminases des tissus végétaux, présentent-elles les mêmes caractéristiques que celles des tissus animaux?

Seule l'évidence expérimentale décidera de cette question. En attendant, nous pourrions supposer qu'elles se ressemblent, mais une identité complète est peu probable. En effect, en physiologie végétale, on voit que la désamination peut ne pas se produire sous certaines conditions. Krebs s'était occupé des seuls tissus animaux, où le ferment semble toujours être présent, et également actif. Jusqu'ici des résultats concluants pour la désamination des tissus végétaux font défaut; c'est là le sujet de l'étude que nous allons entreprendre.

Article 2

Produits du métabolisme des acides aminés

Krebs a démontré dans les articles déjà cités que, dans les tissus animaux, les céto-acides et l'ammoniac sont les premiers produits de dissociation. On n'a pas encore pu montrer d'une façon concluante que ces produits sont les mêmes dans le métabolisme des tissus végétaux.

H. A. Krebs et W. A. Johnson (1937a) ont examiné dans des tissus animaux ce que deviennent ensuite ces céto-acides. Ces auteurs résument leur résultat dans les deux schémas généraux suivants:

R.CO.COOH + R'.CO.COOH + H_2O → R.COOH + CO_2 + R'CH(OH). COOH.

α-céto-acide I + α-céto-acide II + H_2O → acide carboxylique + CO_2 + α-hydroxacide.

R.CO.COOH + R'.CO.CH_2.COOH + H_2O → R.COOH + CO_2 + R'.CH(OH).CH_2.COOH.

α-céto-acide + β-céto-acide + H_2O → acide carboxylique + CO_2 + β-hydroxacide.

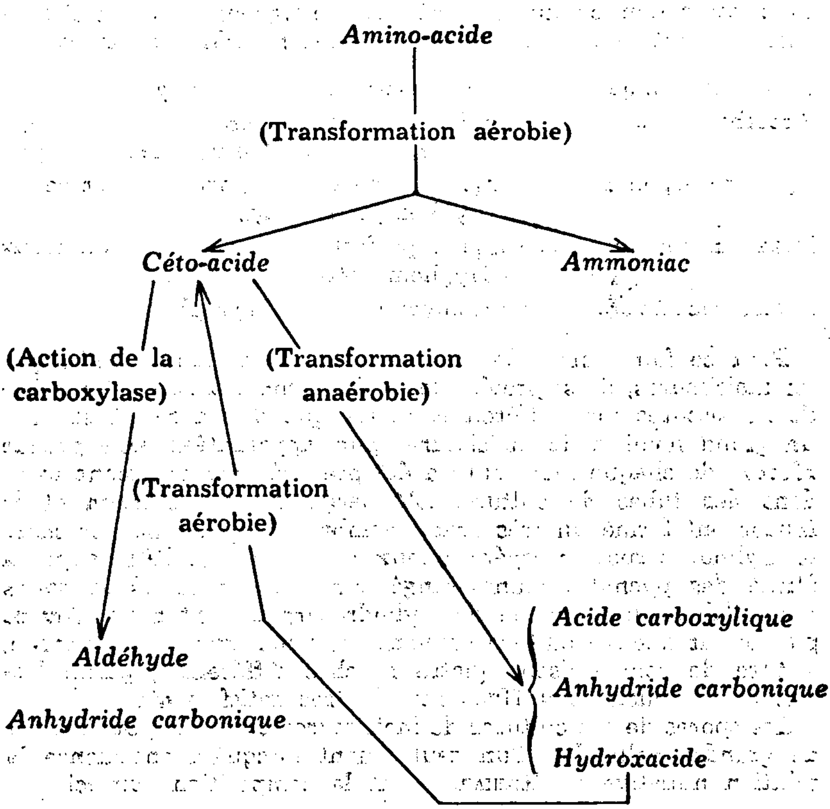
Le fait que l'acide carboxylique apparaît comme produit de réaction dérivant du céto-acide, était déjà connu, car même *in vitro* les céto-acides passent facilement par oxydation à l'état d'acides gras comportant un atome de carbone en moins. La production de l'hydroxacide était connue aussi, car les défenseurs

de l'hypothèse de la désamination hydrolytique avaient déjà fortement attiré l'attention sur ce produit. Mais la réunion des deux produits de réaction dans une seule réaction générale est entièrement nouvelle et, par surcroît, les précisions relatives au *mécanisme* de cette réaction sont nouvelles aussi. KREBS et JOHNSON ont notamment démontré que la réaction n'est pas liée à la présence d'oxygène libre, mais qu'elle peut se produire anaérobiquement par oxyréduction.

Une action oxydante est due au céto-acide II qui, par le fait même est déshydrogéné pour passer à l'état d'hydroxacide. Pour l'acide pyrotartrique par exemple, on a constaté que 50% environ de cet acide est réduit et passe à l'état d'acide lactique et que 50% est oxydé et passe à l'état d'anhydrique carbonique et d'acide acétique. L'importance de la réaction découverte par KREBS et JOHNSON réside en premier lieu en ceci que son application est générale, car elle peut expliquer non seulement la dissociation des amino-acides, mais aussi le métabolisme des matières grasses et des hydrates de carbone. Cette réaction est aussi très importante du fait qu'elle permet d'expliquer la dissociation des céto-acides, sans faire appel à l'enzyme carboxylase. Dans la réaction de KREBS et JOHNSON, comme dans la dissociation par la carboxylase, il se forme à partir du céto-acide de l'anhydride carbonique, mais dans le premier cas, il se forme en même temps des aldéhydes et dans le second cas des acides. Il est donc bien démontré que la dissociation des sucres par la levure, toujours très riche en carboxylase, ne permet pas d'établir un schéma général de cette dissociation.

KREBS et JOHNSON ont examiné également ce que deviennent ensuite les hydroxacides. On a constaté que ces substances sont engendrées anaérobiquement et qu'elles subissent ensuite une réaction aérobie avec absorption d'un atome d'oxygène par molécule d'hydroxacide. Il se reforme alors un céto-acide et ce corps subit de nouveau la réaction anaérobie: nous trouvons donc ici le système de transfert d'oxygène qui avait été établi par SZENT GYÖRGYI (1935) pour l'acide oxalo-acétique.

Dans un deuxième article de la même année, KREBS (1937 b) démontre que la réaction citée plus haut et constatée dans les tissus animaux, a lieu également dans des bactéries. La réaction ici aussi est anaérobie; de plus on a pu démontrer que cette réaction constitue un stade intermédiaire du métabolisme des tissus non-broyés. En résumé, nous aboutissons à la représentation suivante des produits de dissociation résultant du métabolisme des animo-acides:



CHAPITRE II

Méthodes

L'étude du métabolisme des acides aminés dans les tissus végétaux a été faite au moyen des cinq moisissures suivantes, provenant toutes du Centraal Schimmelbureau de Baarn: Aspergillus niger F. Tübingen Schober; Ascochyta pisi Lib.; Cylindrocarpon radiciola Wr.; Fusarium conglutinans Wr. var. callistephi Beach et Mucor racemosus Frs.

Toutes présentent la propriété commune de pouvoir être cultivées dans une solution nutritive synthétique. Leurs places dans

la classification botanique sont assez éloignées l'une de l'autre, mais surtout leurs manières de vivre sont très différentes.

Aspergillus niger	Fungi imperfecti [1]	Saprophyte
Ascochyta pisi	Fungi imperfecti (Sphaeropsideae)	Parasite de la tige, feuille, racine des pois
Cylindrocarpon rad.	Fungi imperfecti (Hyphomyceti)	Parasite des racines de lys.
Fusarium conglutinans	Fungi imperfecti (Hyphomyceti)	Parasite des vaisseaux des asters.
Mucor racemosus	Phycomyceti	Saprophyte

Pour se faire une idée du métabolisme des amino-acides par les moisissures, il est préférable de faire choix d'un petit nombre de moisissures fort différentes plutôt que d'étendre l'étude sur un grand nombre de moisissures plus apparentées. Une grande réserve de chaque moisissure a été préparée par ensemencement dans des tubes de culture. L'Aspergillus, le Fusarium et le Mucor ont formé un très grand nombre de spores sur du malt, le Cylindrocarpon prospéra mieux sur le riz et l'Ascochyta a formé des pycnides jaune-orangé sur des cerises. Nous avons reçu d'abord une souche de Cylindrocarpon dont nous n'avons pu obtenir aucune culture convenable; nous avons reçu ensuite, à titre de comparaison, quatre souches différentes, parmi lesquelles la souche VAN HELL semble très satisfaisante.

Les spores de ces cultures de moisissures croissent pour former de grandes pellicules d'un seul tenant lorsqu'on ensemence la solution nutritive de RICHARD, dont la composition suit ici.

40 gr. de saccharose 10 gr. de glucose 10 gr. de NO_3 NH_4 5 gr. de PO_4H_2K 2,5 gr. de SO_4Mg et une trace de Fe Cl_3	dans un litre d'eau ordinaire

Nous avons donc employé la composition usuelle légèrement modifiée en ceci, que 10 gr. de saccharose ont été remplacés par 10 gr. de glucose par précaution, pour le cas où des moisissures n'hydrolyseraient que lentement le saccharose. En outre, nous

[1]) Souvent on trouvera l'Aspergillus classifié comme Ascomycète (Plectascinées); néanmoins d'après une recherche consciencieuse de M. v. LUYK dans toutes les publications sur ce sujet il n'est pas certain qu'on n'ait jamais trouvé des ascospores.

avons ajouté dans les cultures d'Aspergillus 50 mg. de sulfate de zinc; l'ion zinc exerce un effet favorable sur le développement de cette moisissure mais gêne celui des autres.

Pour l'ensemencement, nous avons suivi la méthode de WEHLBURG (1932). Celui-ci avait obtenu des pellicules plus comparables en ensemençant non pas à partir d'une suspension aqueuse de spores dans l'eau stérile, mais en introduisant les spores directement dans la solution stérilisée. On met 50 cc de cette solution ensemencée dans des flacons d'ERLENMEYER de 100 cc. Les ensemencements et les transplantations du Mucor ont toujours été effectués dans des locaux séparés; cette précaution est necessaire parce que les spores de cette moisissure forment de la poussière avec une facilité extrême et infectent tout d'une manière opiniâtre.

La stérilisation de la solution s'est faite pendant une demi-heure à 106° en autoclave. L'Aspergillus et le Fusarium se développent mieux dans l'obscurité, dans un thermostat, à 27°. Le Cylindrocarpon, le Mucor et l'Ascochyta ont été placés en cercle autour d'une lampe, dans une chambre à température constante (24°), de manière à recevoir tous un éclairement égal (700 lux). L'Ascochyta surtout a besoin de lumière pendant sa croissance. Le Fusarium et le Mucor croissent toujours en-dessous de la surface du liquide. Les trois autres forment aussi du mycélium dans l'air. L'Aspergillus niger forme une pellicule d'un seul tenant après deux jours; pour les autres moisissures une semaine ou plus est nécessaire.

Le métabolisme des amino-acides a été étudié au moyen de pellicules par la méthode des „cultures substituées" de KOSTYTCHEV; en d'autres termes, on enlève le liquide nutritif dans lequel toutes sortes de modifications se sont produites et on introduit audessous de la pellicule, au moyen d'une pipette, une solution stérile d'un amino-acide à concentration et pH connus.

Avec l'amino-acide, il y avait toujours dans la solution deux sels: du phosphate monopotassique (concentration N/15) et du sulfate de magnésium (concentration N/20). Pour obtenir une solution d'asparagine d'un pH = 4,5 environ, on a stérilisé l'asparagine en même temps que les sels. Lorsque pour l'essai on voulait employer de l'acide aspartique, on a ajouté de la lessive de soude avant la stérilisation, car le pH aurait été trop bas si on avait ajouté cette lessive après la stérilisation. Il n'est pas possible de stériliser en présence des sels une solution d'acide aspartique rendue alcaline, parce qu'en milieu alcalin l'amino-azote serait détaché. On stérilise donc séparément les sels et l'amino-acide.

On réunit alors les deux solutions et on les amène ensuite au volume et au pH désirés, avec les précautions d'usage.

Dans tous les essais des Chapitres III, IV, V le volume de la solution de l'acide aminé était de 37,05 cc. Les pellicules sont restées sur cette solution pendant la durée fixée pour l'essai; on a ensuite déversé la solution et on a rincé la pellicule à l'eau distillée sur un filtre. On a pu employer à cet effet 10 cc d'eau de lavage à chaque fois, sans qu'il fût jamais nécessaire d'évaporer ensuite la solution. C'est précisement pour éviter l'évaporation qu'on a employé une pipette de moins de 40 cc pour la solution d'amino-acide; après lavage on a complété le liquide à 50 cc avec de l'eau. On a exécuté les dosages de l'azote ammoniacal, amidé et aminé sur une partie de cette solution.

On a dosé l'ammoniac par distillation sous le vide suivant PARNAS. On a alcalinisé le liquide au moyen de 20 cc d'une solution saturée de borax pour 10 cc de solution à examiner. On a recueilli l'ammoniac dans de l'acide sulfurique (concentration N/20) et on a titré l'excès d'acide au moyen de soude caustique (concentration N/20).

Après évacuation de l'ammoniac, on a dosé l'azote aminé à l'aide du micro-appareil manométrique de VAN SLIJKE (à manomètre fermé). Cette méthode est décrite d'une manière très détaillée dans „Quantitative Clinical Chemistry" (1932) II p. 305 et suivantes; nous avons toujours suivi ces prescriptions, de sorte que nous croyons superflu de donner des détails plus précis.

L'azote amidé a été dosé suivant SACHSSE par ébullition de 3 heures, sous un condenseur à reflux avec de l'acide sulfurique normal, suivie d'une distillation de l'ammoniac sous le vide. La teneur en azote amidé correspond à la différence entre cette détermination d'ammoniac et la première, qui avait été effectuée sans hydrolyse. Les écarts moyens des dosages d'ammoniac et d'amino-azote ont été de 2% et ceux des dosages de l'amino-azote de 5%. Tous les dosages ont été exécutés deux fois.

Chaque essai a été fait dans deux flacons d'ERLENMEYER différents qui ont subi tous les deux le même traitement. Les chiffres des tableaux et des graphiques se rapportent tous à l'activité moyenne de ces deux pellicules de moisissures. Au début, le contenu de chacun de ces deux flacons a été analysé séparément, mais après avoir constaté que les écarts entre les deux pellicules ne dépassaient que légèrement l'erreur moyenne des dosages, on a rassemblé les deux solutions après les avoir complétées au volume voulu et on a exécuté en double les déterminations dans le mélange.

La consommation d'oxygène pendant l'alimentation à l'amino-acide, dont il est question surtout au Chapitre VI, a été déterminée volumétriquement. Les flacons employés à cet effet avaient une contenance de 100 cc environ et l'anhydride carbonique dégagé par la respiration a été absorbé par 0,9 cc de lessive de soude à 40 pour cent. Les flacons ont été secoués environ 80 fois par minute dans de l'eau à température constante. Le changement de volume a été mesuré à pression constante. Pour éviter l'erreur due à la variation barométrique, on a toujours agité un flacon vide témoin, en même temps que les flacons en expérience.

Au Chapitre IV § 3 on décrit des expériences de désamination en l'absence d'oxygène. Pour ces expériences, on a chassé préalablement l'oxygène de la solution d'amino-acide, en faisant passer sans arrêt pendant 10 minutes de l'azote provenant d'une bouteille d'azote comprimé. Mais, comme cet azote est obtenu par distillation fractionnée à partir d'air liquide, le gaz lui-même n'est pas exempt d'oxygène. Toutefois la quantité d'oxygène qui reste dans cette solution est négligeable. Mais l'azote gazeux au-dessus de la solution d'amino-acide pendant l'expérience, devait préalablement être débarrassé d'oxygène. Dans ce but, on a agité le gaz dans une bouteille de 20 litres, pendant 5 minutes avec 30 gr. de $S_2O_4Na_2$ dissous dans 100 cc de NaOH (Concentration 2N). Cette solution absorbe l'oxygène encore mieux que le pyrogallol. En remplissant d'eau la bouteille, on refoule l'azote gazeux, exempt d'oxygène, dans les flacons d'essai. Cette manoeuvre a été répétée trois fois pour chasser l'air qui se trouvait primitivement dans les flacons. Après la quatrième fois, on a bouché les flacons d'Erlenmeyer au moyen d'un bouchon de caoutchouc.

On a déterminé le pH au moyen du comparateur Hellige; pour des volumes plus petits, on a obtenu aussi de bons résultats au moyen du micro-comparateur Hellige. On s'est toujours servi, pour les déterminations du pH pendant ou après une expérience, d'un flacon distinct.

Dans les expériences d'une durée dépassant 4 heures, il s'est produit un déplacement vers un pH plus élevé, qu'on a combattu par l'addition d'acide phosphorique (N/10), introduit par une microburette. On a stérilisé la solution d'acide phosphorique, lors de la préparation de la solution-mère, en la faisant bouillir; avant l'addition des gouttes de solution on a stérilisé également la pointe de la microburette par du formol à 4 pour cent.

Pour les dosages de sucre, on a suivi la méthode de Schoorl.

Dans les essais où l'influence des sucres sur la désamination a été examinée, on a toujours employé la glucose comme sucre, de manière qu'une hydrolyse préalable fut superflue. On a admis une erreur moyenne de 2 pour cent sur les dosages. Pour les déterminations d'azote amidé et aminé dans les pellicules de moisissures, on a réduit celles-ci à l'état d'une bouillie extrêmement homogène et fine en les broyant avec du sable quartzeux; on a précipité ensuite les matières albuminoïdes solubles au moyen d'acide phosphotungstique, suivant les indications du livre „Quantitative Clinical Chemistry" II (1932) page 65 de PETERS et VAN SLIJKE.

L'asparagine employée provenait de la „Amsterdamsche Chininefabriek". Cette préparation renferme également de l'acide aspartique, de sorte qu'il y avait toujours en solution plus d'amino-azote que d'amido-azote. C'est pourquoi nous avons toujours dosé séparément l'azote amidé et l'azote aminé dans chaque solution d'asparagine. Tous les chiffres que nous donnons pour la concentration de l'asparagine, doivent être compris comme se rapportant à la concentration de l'azote aminé et amidé.

L'acide aspartique a été fourni par les „British Drug Houses".

Pour les dosages d'azote aminé on a employé du nitrite de sodium et de l'acide acétique de KAHLBAUM. Avant les mesures, faites sur le liquide des cultures, l'ensemble lui-même des solutions de nitrite de sodium et d'acide acétique avait été dosé par rapport à l'azote aminé. Avec les produits de la maison KAHLBAUM, les quantités trouvées ont toujours été faibles et bien constantes.

On ne trouve pas d'acide oxalo-acétique dans le commerce. Sur la demande de Monsieur le Professeur TH. WEEVERS, Monsieur le Professeur A. SZENT-GYÖRGYI a eu l'amabilité de nous céder une certaine quantité de ce corps, et nous tenons à lui en remercier ici très vivement. Nous exprimons ici également notre gratitude respectueuse à Madame le Professeur J. WESTERDIJK pour les nombreuses indications utiles qu'elle nous a permis de recueillir au sujet du traitement des moisissures et, en même temps, pour les moisissures et les tubes de culture qu'elle a mis généreusement à notre disposition.

CHAPITRE III

Désamidation et désamination par l'Aspergillus niger

§ 1. *Remarques préliminaires relatives au mode opératoire.*

Dans la vie et le développement de tout organisme on peut observer trois espèces principales de métabolisme: les transformations d'hydrates de carbone, de matières albuminoïdes et de matières grasses. Selon les moments, l'un ou l'autre de ces métabolismes, prédomine de beaucoup, mais ils se trouvent toujours ensemble dans des proportions variables de sorte qu'une représentation générale du métabolisme dans un vivant est toujours très complexe.

C'est pourquoi, avant de procéder à un examen quelconque du métabolisme, il est absolument nécessaire de simplifier par des modes opératoires la vie de l'organisme utilisé.

Comme première simplification, nous avons appliqué la méthode des „cultures substituées" qui a déjà été décrite à la page 641.

Pour tous les essais dont il est question dans le présent chapitre, la seule matière organique introduite dans la solution nutritive était l'amino-acide. Guidés par les travaux antérieurs, nous avons employé le plus souvent comme amino-acide l'asparagine et, dans quelques cas, l'acide aspartique, notamment lorsque ce dernier était plus indiqué.

Pour que la représentation du métabolisme de l'amino-acide puisse être simple, il ne suffit pas que l'asparagine soit la source unique du carbone et de l'azote dans le liquide nutritif *extérieur.* Le mycélium — s'il est abondamment nourri — a à sa disposition de grandes réserves nutritives *intérieures,* qui contribuent peut-être à compliquer les processus. C'est pourquoi nous avons toujours appauvri la pellicule de moisissure avant le commencement des essais. A cet effet, nous avons enlevé le liquide dans lequel la pellicule avait été cultivée et nous avons introduit environ 20 cc d'eau stérile sous cette pellicule. Dans ce qui suit, cette eau sera appelée „eau d'appauvrissement". L'effet de l'appauvrissement sur le métabolisme des amino-acides est traité dans un paragraphe spécial.

Enfin, en ce qui concerne ce chapitre, nous sommes toujours partis du cas le plus simple de désamination et de désamidation: pour l'Aspergillus niger elle se produit en milieu acide (§ 2). Nous avons examiné ensuite comment divers facteurs tels que la concentration, le pH, l'âge, etc. influencent le métabolisme des amino-acides; nous avons essayé en même temps de nous représenter au point de vue de la physiologie de la cellule, les rela-

tions entre le métabolisme des acides aminés et d'autres fonctions vitales, telles que la respiration, la perméabilité, la croissance, etc. Dans tous ces essais, nous avons toujours veillé à ce que l'Aspergillus niger demeure, pendant toute la durée des expériences, dans le milieu acide qui, pour lui, est le milieu naturel (§§ 3 à 7).

C'est après avoir construit une représentation générale du métabolisme de l'Aspergillus qu'on est à même d'analyser le comportement de ce micro-organisme en milieu alcalin (§ 8). Enfin, dans un dernier paragraphe, nous discuterons les résultats; pour expliquer ces résultats nous serons amenés à formuler une hypothèse (§ 9). Le chapitre III sera donc divisé selon les paragraphes suivants:

§ 2. Décomposition de l'asparagine en milieu acide.
§ 3. Influence de la concentration du substrat sur la vitesse de décomposition.
§ 4. Influence de „l'appauvrissement" sur la décomposition.
§ 5. La vitesse de décomposition, en fonction de l'âge et du poids de matière sèche.
§ 6. Le métabolisme basal.
§ 7. Accumulation et consommation de l'asparagine dans la cellule.
§ 8. Décomposition de l'asparagine en milieu alcalin.
§ 9. Hypothèse de la „préférence" pour les sucres.

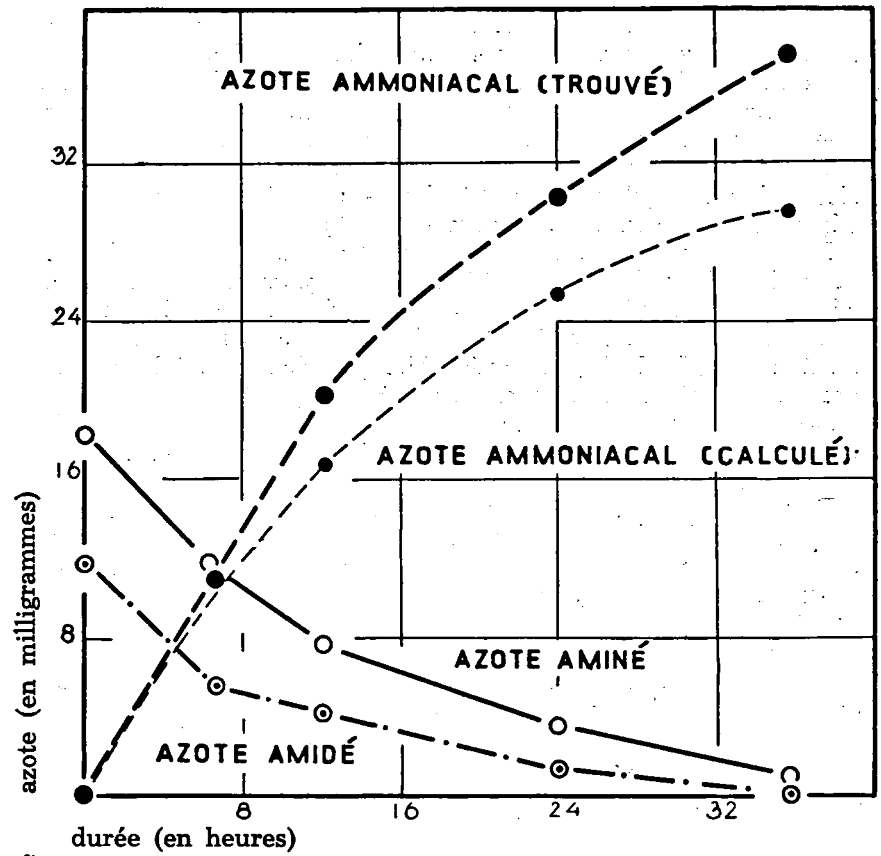
§ 2. *Décomposition de l'asparagine en milieu acide.*

On connaît la préférence marquée de l'Aspergillus pour un pH bas; d'ailleurs dans un substrat renfermant du sucre, il se charge toujours lui-même de l'acidification du milieu. Dans notre essai nous avons employé une solution d'asparagine avec un pH de 3,8. Dans ces circonstances, l'asparagine est facilement dissociée par l'Aspergillus. Tant que la teneur en asparagine varie de 40 à 20 millièmes de molécule-grammes par litre, la vitesse de décomposition dans le même volume est de 2 à 1,5 millièmes de molécule-grammes par heure. Le graphique 1a représente plus clairement le processus.

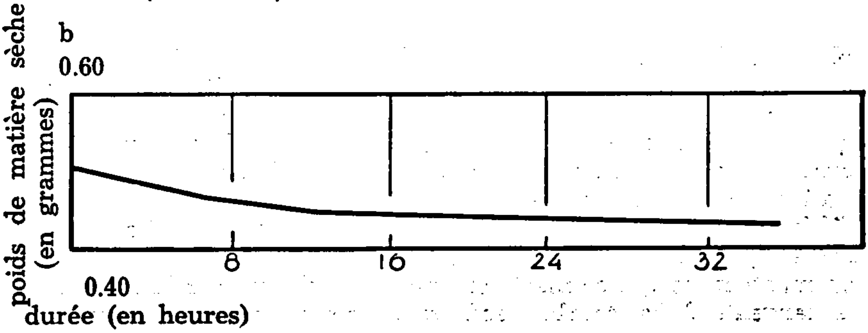
Après 36 heures l'expérience fut suspendue, parce que la quasi-totalité des substances nutritives avait disparu. D'après l'aspect extérieur, la pellicule était encore entièrement normale. Des taches sombres ne sont apparues sur la face inférieure de la pellicule qu'après 60 heures environ. Pendant les premières heures, la teneur en matières sèches diminue un peu, pour rester constante pendant le reste de l'expérience (voir graphique

a

Graphique 1.



b



1b). Tout ceci nous porte à croire que les processus vitaux n'ont pas été troublés par notre dispositif opératoire.

La désamidation et la désamination semblent marcher de pair. Pour les deux premières durées de 6 heures, elles sont respectivement de 41 et 30% et de 33 et 30% des valeurs initiales. Il est bien entendu qu'à cette transformation d'azote correspond une formation appréciable d'ammoniac. La quantité totale calculée d'après l'azote aminé et amidé qui ont disparu, est inférieure à celle qui a été constatée; le mycélium a donc aussi dégagé de l'ammoniac (voir plus loin § 6).

Puisque l'ammoniac ne peut pas s'échapper de la solution acide, le pH du liquide nutritif s'élève rapidement; il est donc nécessaire de rectifier le pH. Au cours de cette expérience on a effectué cette rectification trois fois par jour au moyen d'une solution de PO_4H_3 (concentration N/10), grâce à quoi les variations sont restées réduites entre pH 3,8 et pH 5,8.

Nous signalons avec insistance la très courte durée de l'expérience, car le temps consacré aux expériences avec l'asparagine est généralement beaucoup plus long.

Blanchetière a poursuivi ses cultures du Bactérium fluorescens de 40 à 83 jours, tandis que Iwanoff aussi bien que Schmalfusz et Mothes font continuer la culture de l'Aspergillus pendant deux semaines en moyenne.

Cet écart provient de notre application de la méthode des cultures substituées.

La grande vitesse de décomposition que nous constatons dans cet essai, est très importante pour notre étude. En effet, elle permet d'introduire dans les essais suivants la méthode des vitesses initiales, que l'on va décrire dans le prochain paragraphe.

§ 3. *Influence de la concentration du substrat sur la vitesse de décomposition.*

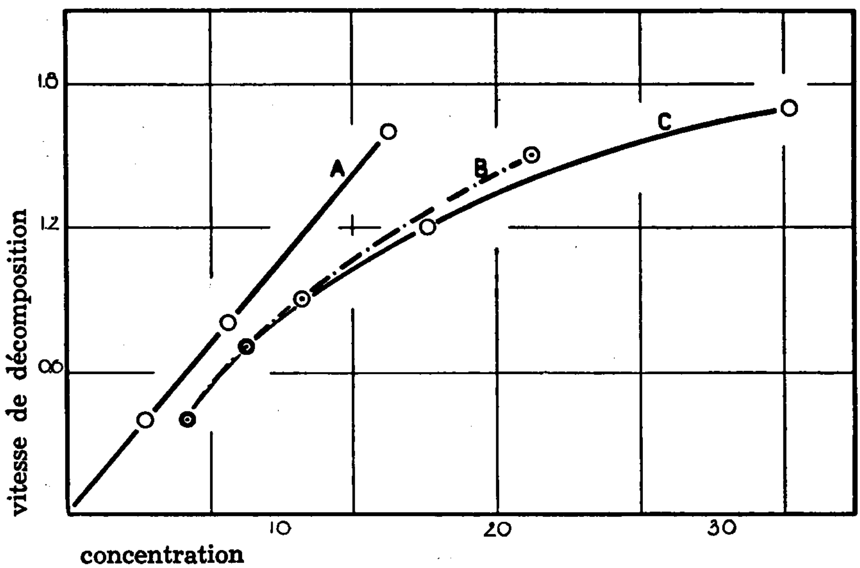
Nous avons vu que dans l'expérience, correspondant au graphique 1, l'Aspergillus se trouve placé dans un liquide dont la concentration varie successivement de la teneur initiale à zéro, à mesure que se poursuit la décomposition. La mesure de la vitesse que nous cherchons, ne peut donc pas se faire à concentration constante par ce mode opératoire. Non seulement la concentration varie, mais la pellicule elle-même passe par des états différents. En effet, à mesure que se prolonge son séjour sur l'asparagine, le nombre et l'influence des facteurs limitateurs augmentent, ce qui se manifeste sur le graphique par le fait que la tangente à la courbe tend vers l'horizontal. Pour pouvoir

mesurer la vitesse de décomposition à concentration constante, nous serons amenés à rendre constants d'une part la concentration, d'autre part les facteurs limitateurs.

On pourra considérer comme constante une concentration qui variera très peu au cours des essais. La condition sera réalisée si les essais sont très courts. Nous prendrons alors comme concentration à laquelle nous rapporterons la vitesse mesurée, la concentration initiale. Ceci revient à considérer la courbe comme une droite sur une petite partie de son parcours. Nous nous appuyons sur HALDANE-STERN (p. 7): „Glücklicherweise bleibt in vielen Fällen die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion über eine relativ lange Periode hinweg konstant."

D'autre part, les facteurs limitateurs, eux aussi, auront une variation négligeable pendant la très courte durée de nos essais

Graphique 2.



Rapport entre la vitesse de réaction et la concentration pour les pellicules appauvries. pH = 4,8; durée de l'essai: 4 heures.

Courbe A: les flacons d'essai ont été secoués pendant les expériences.

Courbe B et C: les flacons d'essai n'ont pas été secoués.

A et C: azote aminé,

B: azote amidé,

La vitesse est exprimée en millièmes de molécule-grammes d'azote par litre par heure; la concentration en milligrammes par 37 cc.

(4 heures). En effet, toutes les pellicules à employer dans un essai, ont eu le même passé.

Si on veut appliquer cette méthode, on doit veiller à ce que le commencement de la réaction soit bien net, et ne présente ni retard ni mélange à d'autres réactions.

A cet effet nous avons pris deux précautions: application de la méthode d'appauvrissement (voir § 4), homogénéisation de la solution par des secousses répétées des flacons. Cette seconde recommandation vient de FÜRTH et LIEBEN (1922). Les flacons ont été agités à la main environ toutes les dix minutes. Le graphique 2 montre l'utilité des secousses.

Les trois courbes de ce graphique montrent que la vitesse de réaction augmente avec la concentration. Dans les flacons agités (courbe A) la vitesse est plus grande, à même concentration, que dans les flacons non agités (courbes B et C). En outre, l'accroissement de la vitesse est, à concentration élevée, plus considérable pour les flacons secoués que pour les flacons non-secoués.

On remarquera que la courbe A du graphique 2 estime droite. Ceci signifierait que la vitesse de réaction fût directement proportionnelle à la concentration. Ceci n'est pas exact car c'est fortuitement que la courbe est réduite à une droite. Lorsqu'on relève un plus grand nombre de points, il apparaît toujours une courbe.

Par cette même méthode des vitesses initiales, nous pourrons examiner différents facteurs qui jouent un rôle dans le métabolisme étudié. Souvent c'est la seule méthode correcte et c'est toujours la plus expéditive.

§ 4. *Influence de „l'appauvrissement" sur la décomposition.*

C'est d'une publication remarquable de WIELAND et CLAREN (1932) que nous avons tiré la méthode de „l'appauvrissement" qui est d'application générale à notre étude.

L'importance de cette méthode, d'après ces auteurs, vient de ce qu'elle tient le milieu entre les études in vivo et in vitro.

WIELAND et CLAREN partent de la constatation que des préparations macérées et des produits d'autolyse se sont montrés d'une grande utilité pour l'étude de certains processus biochimiques, mais on pourrait citer cependant un certain nombre de réactions pour lesquelles ces préparations sont à la fois trop peu actives et trop peu stables. Par contre, lorsque l'agent de réaction est un tissu vivant, il produit non seulement la réaction étudiée, mais en même temps des réactions dues aux substances emmagasinées dans le protoplasme.

Ces réactions secondaires contrarient et compliquent la réaction principale. Pour ce motif, WIELAND laisse d'abord la levure digérer son contenu cellulaire, ensuite, avec cette levure appauvrie mais encore vivante, il obtient les réactions chimiques simples qu'il recherche.

Dans le présent paragraphe, on étudiera l'activité de pellicules appauvries à différents pH.

a) *Activité en milieu acide de pellicules appauvries.*

Après que les pellicules de moisissures ont séjourné pendant 12 heures sur l'eau distillée, on les a placées pendant 4 heures sur une solution d'asparagine amenée à un pH de 4,5. Le résultat est indiqué dans le tableau 1: le signe + indique une augmentation de teneur en azote et le signe — une diminution. Les chiffres se rapportent à une même série de pellicules provenant du même ensemencement. Le poids de matière sèche a été déterminé sur deux pellicules de moisissure.

TABLEAU 1.

Caractéristique de la pellicule de moisissure	Age de la pellicule de moisissure	Poids de la matière sèche en G.	Azote ammoniacal mg.	Azote amidé mg.	Azote aminé mg.
appauvrie	67 heures	0,47	+ 4,8	— 2,8	— 3,3
non appauvrie	67 heures	0,51	+ 5,1	— 4,5	— 3,1
appauvrie	105 heures	0,87	+ 6,0	— 4,0	— 4,4
non appauvrie	118 heures	1,06	+ 5,2	— 4,4	— 3,8
appauvrie	248 heures	1,12	+ 2,7	— 3,8	— 3,4
non appauvrie	260 heures	1,13	+ 2,4	— 5,5	— 3,2

D'après le tableau 1 on voit que dans le cas des pellicules plus âgées l'appauvrissement a légèrement majoré la production d'ammoniac; d'autre part, il semble que l'appauvrissement agisse d'une manière défavorable sur la désamidation et d'une manière favorable sur l'utilisation de l'azote aminé, mais l'influence est en tout cas très faible.

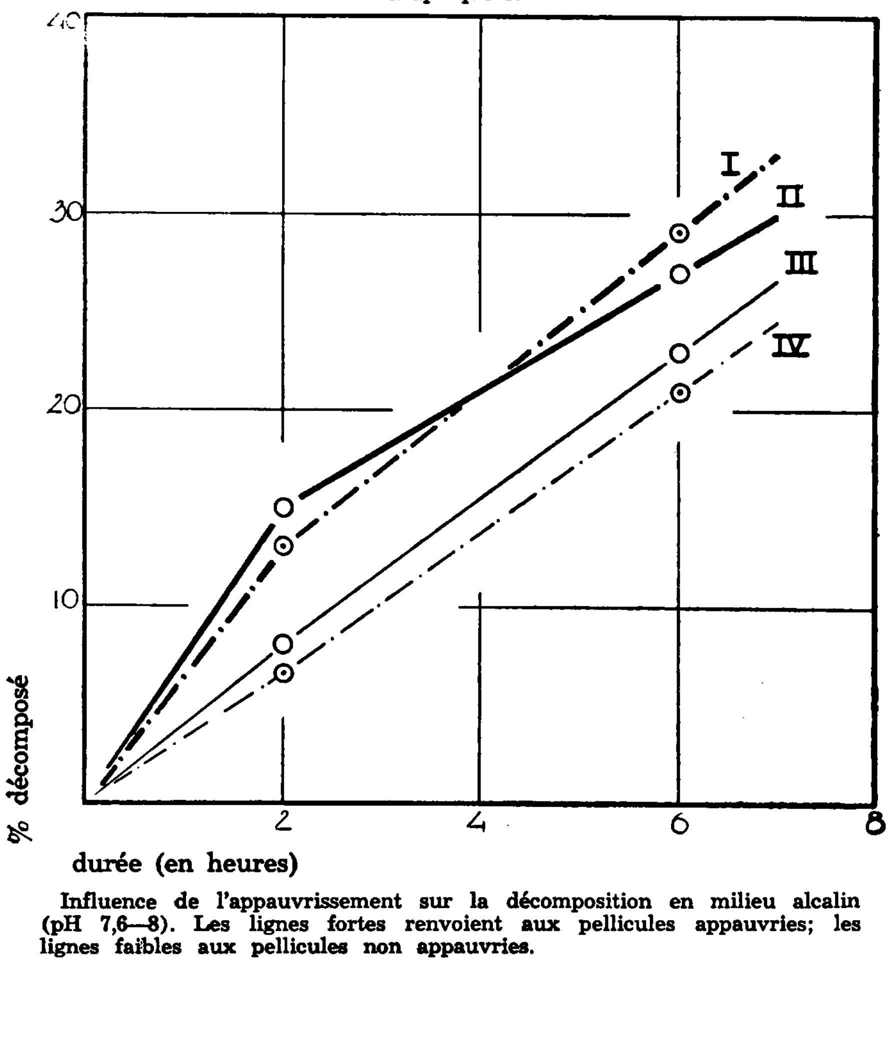
Il est évident que les circonstances dans ce milieu acide sont tellement favorables à l'activité de la cellule que l'appauvrissement ou le gavage du mycélium n'a que peu ou pas de conséquences sur la vitesse de décomposition. On peut, en se basant sur ces chiffres, déclarer non fondée la crainte que le séjour pendant 12 heures sur l'eau distillée serait nuisible à l'Aspergillus. Il n'est pas sans intérêt de constater que les pellicules

appauvries ne réagissent pratiquement jamais avec une activité moindre vis-à-vis de l'asparagine que les non-appauvries.

b) *Activité de pellicules appauvries en milieu alcalin.*

On a employé pour cet essai une solution d'asparagine à 0,4%. Au moyen de la lessive de soude cette solution a été amenée préalablement à un pH 7,6. Le pH n'a pas encore changé après deux heures, mais après six heures il s'est élevé au pH 8,0. Cette variation de pH est due à l'ammoniac qui se produit toujours

Graphique 3.



Influence de l'appauvrissement sur la décomposition en milieu alcalin (pH 7,6—8). Les lignes fortes renvoient aux pellicules appauvries; les lignes faibles aux pellicules non appauvries.

abondamment dans nos expériences.

On conclut du graphique 3 qu'en milieu alcalin l'appauvrissement influe favorablement sur l'activité des pellicules alors qu'en milieu acide le même appauvrissement ne cause qu'une variation négligeable dans la réaction.

La différence n'est pas considérable, mais elle est néanmoins réelle; il nous suffit ici de constater l'influence de l'appauvrissement. Nous serons amenés plus tard (voir § 8) à examiner la question de la valeur maxima de cette influence rétardatrice qui se produit sur le métabolisme des acides aminés dans des pellicules non appauvries.

§ 5. *La vitesse de décomposition en fonction de l'âge et du poids de matière sèche.*

Nous avons déterminé le rapport entre l'âge et la vitesse de réaction, afin de connaître quel serait le moment le plus propice, pour suspendre la culture sur sucre et pour entreprendre l'expérience sur les acides aminés.

Du graphique 4a on conclut, que la vitesse de décomposition passe par un maximum. Le point optimum indique le moment le plus favorable pour suspendre la culture. Il s'ensuit que l'Aspergillus exerce une activité maxima sur l'asparagine dans des pellicules de 3 à 4 jours.

Du graphique 4b on conclut que pour des âges donnés, l'âge est fonction du poids de matière sèche. Or, la vitesse est fonction de l'âge.

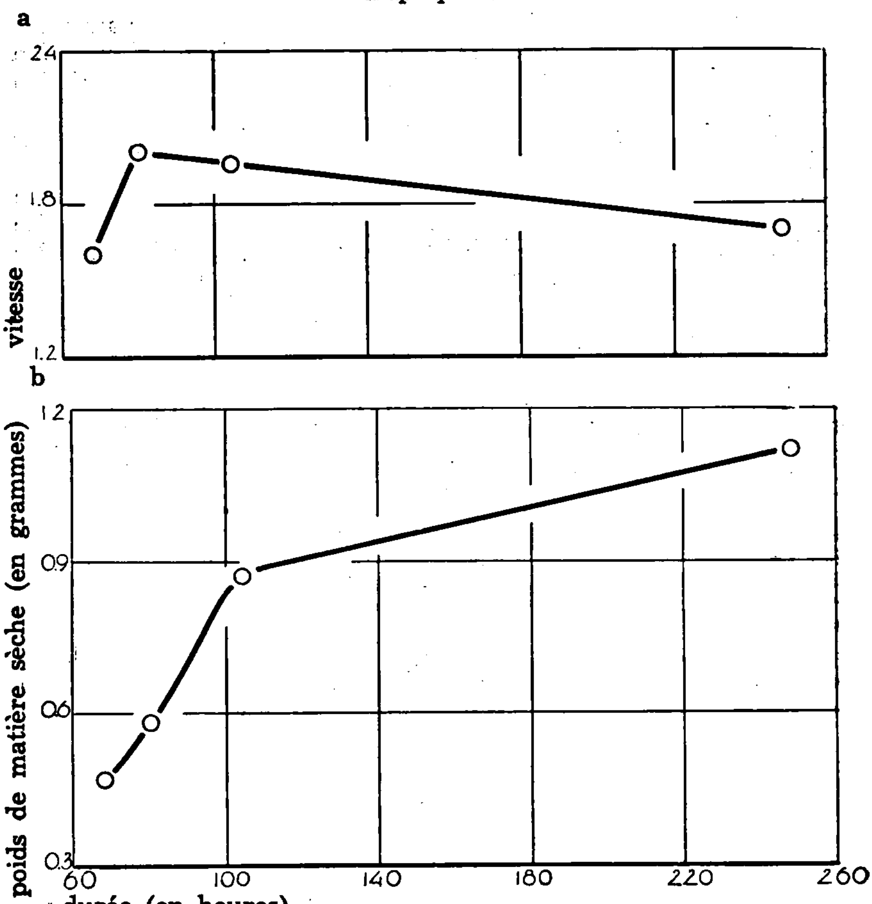
Donc, le poids de matière sèche passe également par un optimum. C'est pourquoi on pourrait se faire guider dans le choix des pellicules par leur poids de matière sèche.

§ 6. *Le métabolisme basal.*

Au cours du premier essai de notre étude (voir graphique 1) nous avons retrouvé dans le liquide extérieur plus d'ammoniac que celui qui correspond à l'azote détaché de l'asparagine. Dans la suite de notre étude, nous avons constaté que c'est là le cas le plus fréquent pour les essais prolongés. Quelques fois néanmoins une partie de l'azote de la solution extérieure semblait rester dans la moisissure. Il en sera question au paragraphe suivant. Le présent paragraphe a trait uniquement au cas le plus fréquent où tout l'azote de l'asparagine se retrouve dans le liquide extérieur à l'état d'ammoniac, où il vient s'ajouter en plus de l'ammoniac provenant de la pellicule.

Le fait est singulier. Les pellicules appauvries sont dans un

Graphique 4.



Activité de pellicules d'âges différents sur une solution de 0,5% d'asparagine; durée de l'essai: 4 heures; pH 4,7. Les pellicules ont été appauvries durant 12 heures.

Graphique 4 a.

Rapport entre l'âge et la vitesse de décomposition.

Graphique 4 b.

Rapport entre l'âge et le poids de matière sèche. La vitesse est exprimée en millièmes de molécule-grammes d'azote, décomposés par litre par heure.

état de sous-nutrition non seulement en carbone, mais aussi en azote. On leur administre de l'asparagine; on couvre ainsi autant que possible leur besoin de carbone. Tout en assimilant le car-

bone, la moisissure transforme l'azote de l'asparagine sous la forme la plus assimilable: l'ammoniac; mais c'est précisément l'ammoniac qui retourne alors à la solution.

Le fait que l'azote de l'asparagine reste inutilisé décèle un arrêt momentané de la synthèse de l'albumine.

Bien plus, la production d'un excès d'ammoniac trahit une prédominance momentanée de la consommation sur la formation d'albumine. En effet, la formation d'ammoniac supplémentaire décèle que l'albumine a été consommée, non par hydrolyse, mais par respiration.

Par ailleurs, dans des conditions bien déterminées, l'hydrolyse de l'albumine peut apparaître également. Celle-ci se manifeste par une augmentation de la teneur de la solution extérieure en amino-azote. C'est là une exception, mais néanmoins, elle se rencontre.

Comment interpréter ces phénomènes?

Tout d'abord nous insisterons sur le point que la prédominance de la dissociation sur la synthèse n'est que *momentanée*. Si on ajoute par exemple du sucre à la solution extérieure, l'ammoniac disparaît très rapidement, indice d'une régénération de l'albumine; en outre cette nutrition par le sucre amène très vite la pellicule appauvrie à doubler son poids de matière sèche, signe de prolifération et de croissance des cellules.

La prédominance que peut acquérir la consommation de l'albumine, soit par respiration, soit par hydrolyse, n'est donc que passagère, et ne trouble pas le dynamisme vital de la pellicule. On doit tenir compte aussi de ce que ces processus de respiration et d'hydrolyse ne sont pas *spéciaux* aux pellicules appauvries. L'appauvrissement les amène au premier plan et les fait mieux apparaître, mais pendant l'alimentation au sucre, ces processus existent également. Nous avons affaire simplement à des composantes, momentanément prédominantes, d'un échange fondamental de matières, entretenu par la moisissure au cours de son existence toute entière.

Cet échange fondamental qui, nous l'avons vu au paragraphe 1, comprend le métabolisme d'hydrates de carbones, d'albumines et de matières grasses, a été très bien étudié dans l'alimentation humaine et animale; on lui a appliqué l'expression consacrée de „métabolisme basal". Nous avons pensé que mutatis mutandis, cette expression pouvait s'appliquer également aux végétaux. Notre méthode de travail par les pellicules appauvries nous amène nécessairement à rencontrer ce métabolisme basal. C'est précisement par la présence de ce métabolisme que nos études

diffèrent des études in vitro.

Tout d'abord, qu'entendons-nous par le métabolisme basal dans les moisissures?

Dans l'ensemble de la pellicule de moisissure il meurt continuellement du vieux mycélium et il se régénère sans cesse du nouveau. Dans chaque cellule vivante distincte, il y a toujours, côte à côte une dissociation et une synthèse d'albumine. Si les circonstances sont favorables (par exemple lorsque des matières nutritives organiques sont disponibles), la synthèse peut prévaloir sur la dissociation, tandis que dans le cas de la sous-nutrition la dissociation prédomine. Par matières nutritives nous entendons non seulement celles de l'extérieur, mais aussi les réserves accumulées à l'intérieur du mycélium, par exemple le glycogène (voir BENNETT-CLARK et LA TOUCHE 1935).

Pour certains états des cellules, il y a presque équilibre entre dissociation et synthèse. Cet équilibre se produit lorsque aucune matière n'est absorbée de l'extérieur et que la provision intérieure des réserves est encore suffisante. S'il n'y a plus de matière disponible ni à l'extérieur ni à l'intérieur, l'équilibre ne peut plus exister, car le maintien de cet équilibre vital absorbe de l'énergie.

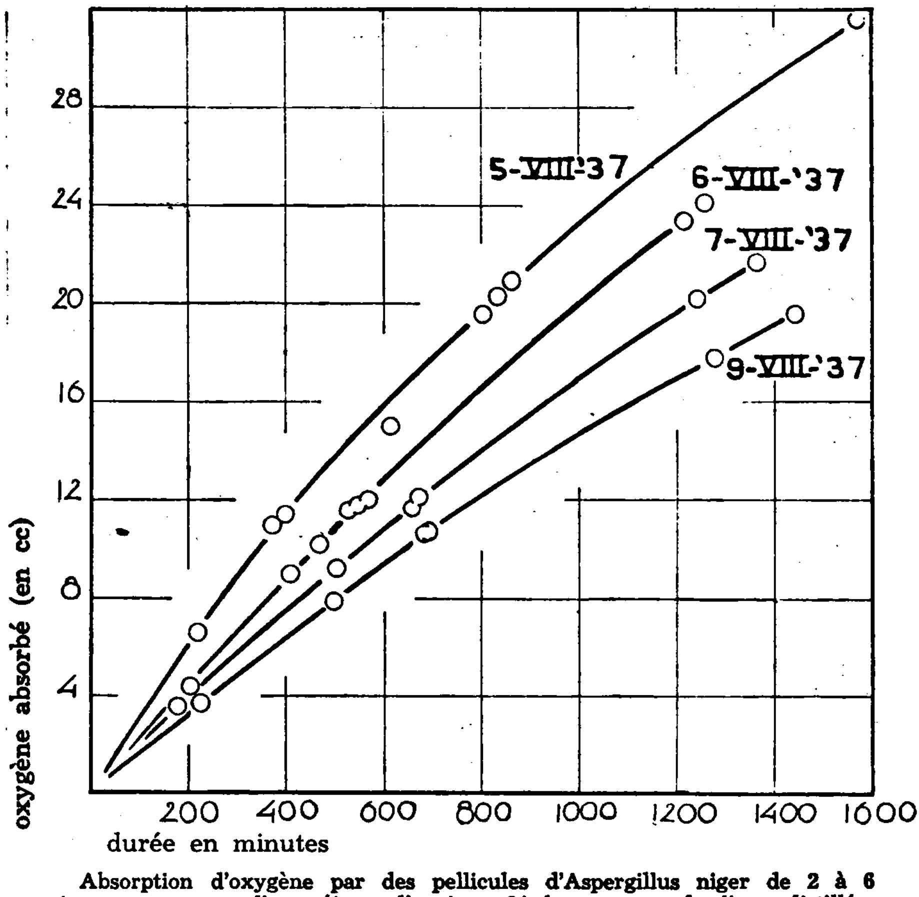
Cette énergie est précisément l'énergie minima qui suffit pour satisfaire aux besoins vitaux élémentaires du moment présent. Sous ces conditions, il ne se produit ni croissance ni alimentation par l'extérieur, ni fructification ni élévation appréciable de température, par contre il n'y a pas non plus de dépérissement. C'est ce minimum d'énergie nécessaire pour garantir la continuation de l'existence que représente le métabolisme basal.

Du fait que le métabolisme basal représente une énergie, on peut l'exprimer en calories. On peut aussi l'exprimer en „consommation de matières" ou en absorption d'oxygène, parce que ces quantités déterminent aussi la combustion qui a lieu dans la cellule.

Le graphique 5 démontre comment le métabolisme basal, mesuré par l'absorption d'oxygène, décroît dans diverses pellicules d'une même série à mesure qu'elles vieillissent; et il indique également comment l'énergie minima décroît en fonction du temps, dans une pellicule déterminée.

Il importe de remarquer que ces courbes ont toutes un trajet très régulier et qu'il n'y a donc pas d'incidents brusques lors de la décroissance du métabolisme en fonction du temps. La diminution en fonction de l'âge a lieu, elle aussi, régulièrement. L'appauvrissement qu'avaient subi les pellicules avant l'essai,

Graphique 5.



Absorption d'oxygène par des pellicules d'Aspergillus niger de 2 à 6 jours, au cours d'un séjour d'environ 24 heures sur de l'eau distillée; pH = 4,0. Pellicules préalablement appauvries pendant 12 heures. Température 25°.

était donc suffisant pour isoler le métabolisme basal, tout en étant assez modéré pour ne pas nuire à la vie.

Il est évident que le métabolisme basal n'est pas une grandeur constante; il peut varier par l'intervention d'un très grand nombre de facteurs tels que par exemple le pH, la température, la teneur en réserves nutritives et la durée de l'appauvrissement. Nous verrons au chapitre VI § 2, si le métabolisme basal est

modifié par l'alimentation.

Dans nos recherches le métabolisme basal se manifeste par l'absorption d'oxygène et par une élimination de corps azotés. Nous avons rassemblé quelques données quantitatives au sujet de cette dernière manifestation. Elles indiquent toutes une dissociation d'albumine et il fallait s'y attendre, car dans nos essais les processus de dissociation prennent partout une légère prédominance sur la synthèse. Mais nous insistons particulièrement sur le fait que la consommation d'albumine par hydrolyse ou par respiration n'est pas la seule manifestation du métabolisme basal. Quant à la dissociation, il n'est même pas vrai que dans les pellicules appauvries elle prime *dans tous les cas* sur la synthèse. WIELAND et WILLE (1932) l'ont démontré pour la levure appauvrie. Ils ont constaté pendant l'appauvrissement une diminution de 10% des composants insolubles du protoplasme et de 50% des hydrates de carbone solubles, mais une augmentation de 100% des lipoïdes. Pendant l'appauvrissement il se produit donc une synthèse de matières grasses. Les auteurs admettent que, dans le cas de la levure, 60% de la diminution totale portent sur la dissociation de l'albumine.

Nous avons, dans le cas de l'Aspergillus, trouvé le plus souvent assez peu d'amino-azote dans l'eau d'appauvrissement; 0,5 mg est un maximum. L'hydrolyse de l'albumine est quantitivement la dissociation la moins importante et le fait que souvent on ne peut constater d'augmentation d'amino-azote dans le liquide extérieur, indique que cette hydrolyse est une manifestation de dissociations locales dans certains filaments du mycélium.

La production d'ammoniac, retrouvé dans l'eau d'appauvrissement, a varié entre 1,5 et 4 milligrammes. Nous n'avons jamais trouvé moins que 1,5 milligrammes. La consommation de l'albumine par respiration est donc une manifestation générale du métabolisme basal pendant l'appauvrissement. Plusieurs facteurs extérieurs tels que l'âge, le milieu alcalin, etc., favorisent la production d'ammoniac.

Au cours de l'alimentation aux acides aminés, à condition que la concentration soit élevée, et que les conditions d'existence soient favorables, les quantités d'azote aminé et ammoniacal résultant du métabolisme basal, peuvent être négligées. Mais le métabolisme basal a une grande importance pour l'interprétation des chiffres se rapportant à l'azote, lorsque les concentrations sont faibles comme le montre le tableau 2. On a dans le tableau 7 un exemple de l'influence des conditions d'existence défavorables (manque d'oxygène).

TABLEAU 2.

Influence du métabolisme basal sur la teneur d'ammoniac exprimée en milligrammes. Teneur initiale en acide aspartique 0,4%; volume 37 cc, pH = 5,0; durée de l'expérience 4 heures. Les pellicules de moisissure ont été appauvries pendant 12 heures.

	Azote aminé			Azote ammoniacal		
Dilution	Début	Fin	Diminution	Début	Fin	Augmentation
A 1/1	7,81	4,68	3,13	0,19	3,73	3,54
B 1/4	1,94	0,90	1,05	0,05	2,61	2,56
C 1/16	0,49	0,02	0,47	0,01	1,88	1,87
D 1/32	0,24	0,00	0,24	0,01	1,89	1,88
E 1/64	0,12	0,00	0,12	0,00	1,88	1,88

Le milieu acide est favorable à l'Aspergillus et, en ce milieu, nous ne trouvons nulle part, ni même aux concentrations les plus faibles, de libération d'amino-azote; d'autre part, aux concentrations les plus faibles (C, D et E), l'ammoniac résulte presque exclusivement du métabolisme basal, tandis qu'aux concentrations élevées le métabolisme basal fournit toujours de l'ammoniac, mais la partie de beaucoup la plus importante provient de l'azote aminé.

Du tableau 2 on conclut, que pour le cas des concentrations faibles, la mesure du métabolisme des acides aminés se fait exclusivement sur les chiffres trouvés pour l'azote aminé; les chiffres trouvés pour l'azote ammoniacal ne sont d'intérêt que pour le seul cas des concentrations élevées.

§ 7. *Accumulation et consommation de l'asparagine dans la cellule.*

Le métabolisme basal explique pourquoi on trouve dans le liquide plus d'ammoniac que la quantité correspondant à l'asparagine transformée du liquide.

Mais il a déjà été dit que nous constatons parfois le contraire; la fraction d'azote qui provient de l'asparagine et qui est absorbée par le mycélium, bien qu'elle soit faible est nettement supérieure aux limites d'erreurs des méthodes de dosage.

Le tableau 1 illustre ce que nous venons de dire.

Dans quelles conditions le mycélium retient-il de l'azote sous forme organique?

Nous avions tout d'abord cru que ce phénomène ne pouvait se constater que pour les expériences de courte durée, mais lorsque nous eûmes à notre disposition un plus grand nombre

de données expérimentales, nous avons constaté que cette absorption d'azote était fonction, en premier lieu de la concentration.

TABLEAU 3.

Azote de l'asparagine retenu par le mycélium dans diverses séries d'expériences. Une expérience „courte" se rapporte à une durée de 4 heures au plus. Une concentration „élevée" est celle d'une solution d'asparagine à ± 0,5% (35 millièmes de molécule-grammes par litre); pH < 7.

Choix de l'essai	Courte durée	Concentration élevée	Permanence de l'azote sous forme d'asparagine dans le mycélium
A	—	—	—
B	—	—	—
C	+	+	+
D	+	+	+
E	+	—	—
F	—	+	+

On ne s'attendra guère à ce que la durée, pendant laquelle la moisissure peut retenir de l'azote dans le cas des solutions concentrées, soit très longue. Après 8 à 12 heures nous avons toujours retrouvé, sous forme d'ammoniac, la totalité de cet azote, mais pour les expériences de 4 heures on constate régulièrement une absorption d'azote.

Comment expliquer cela?

Une diminution du métabolisme basal est peu probable; nous y reviendrons au chapitre VI. On peut encore considérer la possibilité de l'assimilation de l'asparagine par le mycélium, ou supposer une simple absorption.

A priori, la synthèse de l'albumine à partir de l'asparagine comme seule source de carbone et d'azote n'est pas probable, car l'Aspergillus alimenté de la sorte prospère très peu, et a toujours besoin de sucre pour son développement. L'hypothèse de l'absorption par perméabilité est plus vraisemblable, car on constate souvent que la perméabilité augmente avec la concentration. Seules des données expérimentales pourront résoudre ce problème.

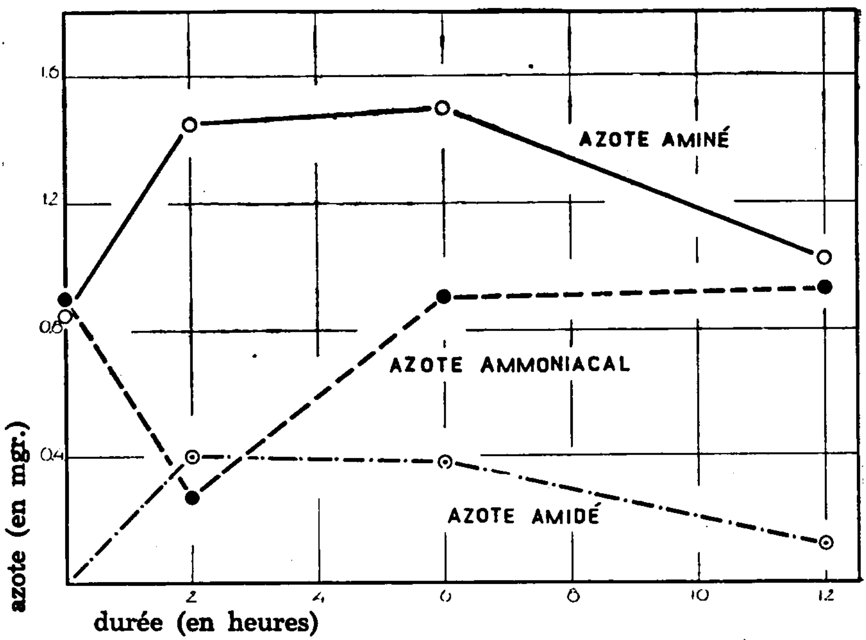
C'est pourquoi nous avons analysé la pellicule elle-même quant à sa teneur en azote amidé et aminé, et nous avons constaté dans les expériences de 4 heures que, régulièrement, 15 à 20% de l'azote qui avait disparu, a pu être retrouvé dans la pellicule

sous forme d'azote amidé et aminé. Il est donc clair que l'absorption d'azote par le mycélium résulte d'une accumulation à laquelle ne correspond aucune consommation.

Il importe en outre de savoir si l'accumulation de l'asparagine est de nature *permanente,* si elle contribue à de réserves nutritives dans le mycélium, ou si elle est temporaire et provoquée par un apport trop brusque et trop considérable.

Cette question peut être résolue en prolongeant la durée de l'action du mycélium sur l'asparagine (voir graphique 6).

Graphique 6.



Teneur en azote de pellicules appauvries après un séjour de 2 à 12 heures sur une solution d'asparagine à 0,5%; pH = 4,7.

Le graphique 6 montre qu'une assimilation complète de l'asparagine qui a pénétré dans les cellules grâce à leur perméabilité n'est pas dès le début possible parce que la capacité maxima de consommation est temporairement dépassée; en effet après 12 heures, les pellicules sont revenues à leurs teneurs originelles, en azote amidé et aminé.

En nous reportant au graphique 6, nous pouvons examiner maintenant aussi si l'accumulation d'asparagine par le mycélium correspond quantitativement à la quantité d'azote qui était disparue de notre solution.

Nos chiffres semblent montrer qu'il n'en est pas ainsi. Nous n'avons jamais trouvé plus de 1 mg. d'azote accumulé et non-consommé dans le mycélium; la quantité d'azote qui n'est pas retournée dans la solution peut, par contre, atteindre 2 à 3 milligrammes. Une petite quantité d'azote pourrait donc être engagée dans la synthèse de l'albumine. En faveur de cette interprétation plaide également le fait que dans la pellicule l'ammoniac a diminué après 2 heures. On pourrait à ce propos penser que la faible teneur en hydrates de carbone agisse pour limiter la synthèse et y trouver une explication du temps très court, durant lequel l'ammoniac diminue.

Le graphique 6 nous montre encore qu'il suffit de laisser agir le mycélium durant quatre heures; bien qu'à la fin de cette durée on n'obtienne que 80 à 85% d'azote libéré, ceci ne nous empêche pourtant pas de comparer les vitesses de réaction, effectuées par les mycéliums. On ne dispose jamais de mesures absolues pour les vitesses de réaction dans les matières biologiques.

Les préparations de moisissures ont, outre l'inconvénient que leurs vitesses — même celles des plus actives — restent encore sensiblement inférieures aux vitesses de réaction in vivo, encore celui d'avoir une vitesse de réaction qui est souvent la vitesse de diffusion et non pas la vitesse de la réaction enzymatique.

Résumons comment nous comprenons les diverses phases du métabolisme: d'abord absorption par perméabilité; l'asparagine qui a pénétré dans la cellule est désamidée et désaminée immédiatement en très grande partie, pour être renvoyée ensuite immédiatement dans la solution sous forme d'ammoniac. Le métabolisme basal y ajoute encore le plus souvent son action. L'hydrolyse de l'albumine n'a lieu qu'incidemment, et cela dans le seul cas de vieilles pellicules. Dans les pellicules jeunes, on observe plutôt des réactions de synthèse que des réactions d'hydrolyse. La synthèse ne pourra devenir importante qu'en présence de sucres dans la solution extérieure.

§ 8. *Décomposition de l'asparagine en milieu alcalin.*

Au paragraphe 3 nous avons dit que, pour assurer une répartition homogène des matières, le liquide tout entier était secoué à la main à plusieurs reprises. Cette mesure est toujours efficace

pour un essai en milieu acide. Mais il n'est pas exclu que l'Aspergillus niger placé dans un liquide alcalin rende le milieu *localement* acide.

L'idée qu'une acidification locale du milieu peut déformer la représentation de la désamination en milieu alcalin, nous l'avons empruntée à une publication de KLUYVER et PERQUIN (1933), dans laquelle se trouve longuement exposée une critique de l'emploi courant de pellicules de moisissures pour l'examen du métabolisme. Comme objection principale ces auteurs citent la différence entre le mycélium émergeant et le mycélium immergé et l'irrégularité de la face inférieure de la pellicule de moisissure. Cette dernière circonstance donne très facilement lieu à des modifications locales de la concentration et du pH de l'asparagine.

Les auteurs écartent tous les inconvénients signalés par eux en agitant constamment la moisissure dès le début de la culture. Cette méthode rend comparables les résultats de différentes séries de culture, et ils le montrent par le dosage de l'acide kojique.

Nous laissons en suspens la question si cette méthode doit être étendue à toute étude du métabolisme. Il est à remarquer que le mycélium agité acquiert une nature spongieuse et perd le caractère d'une moisissure normale en échange d'une plus grande homogénéité de la pellicule.

Nous croyons pouvoir écarter ces inconvénients en appliquant la méthode des „cultures substituées". Dans la culture dans le thermostat nous obtenons ainsi une pellicule normale et pendant l'expérience sur l'amino-acide toutes les variations locales du pH sont évitées par l'agitation.

Pour éviter l'acidification locale, nous avons examiné la désamination en milieu alcalin, au moyen du dispositif opératoire qui permet de déterminer l'absorption d'oxygène pendant le cours d'une réaction.

Admettons provisoirement que la consommation d'oxygène constitue une mesure de la désamination. C'est au chapitre VI que nous reviendrons sur cette hypothèse pour la discuter en détail.

La détermination de l'absorption d'oxygène a déjà été décrite au chapitre II. Nous ajouterons quelques détails qui se rapportent à l'essai dont il s'agit ici.

Les moisissures ont été cultivées d'abord dans 20 cc de liquide nutritif dans un thermostat, puis appauvries dans une solution-tampon de phosphate à pH = 8,8. Une certaine quantité d'acides,

formés dans la pellicule pendant la culture, est éliminée de cette façon. Après 2 heures le pH de cette „eau d'appauvrissement" a descendu à 8,3. On ajoute ensuite à trois ballons une solution d'acide aspartique à pH = 8,8; à titre de contrôle on a agité deux ballons dans lesquels il n'y avait qu'une solution-tampon de phosphate à pH = 8,8. Le tableau 4 et le graphique 7 indiquent le résultat de cet essai.

TABLEAU 4.

Consommation d'oxygène (en cc) en présence et en l'absence de l'acide aspartique (47 mg) dans 10 cc d'une solution-tampon de phosphate à pH = 8,8. Température 22,5°. Pression barométrique: 762 millimètres. Les pellicules sont appauvries pendant 2 heures. Le pH a été rectifié deux fois par de la soude (N/10). Durée de l'essai: 22 heures.

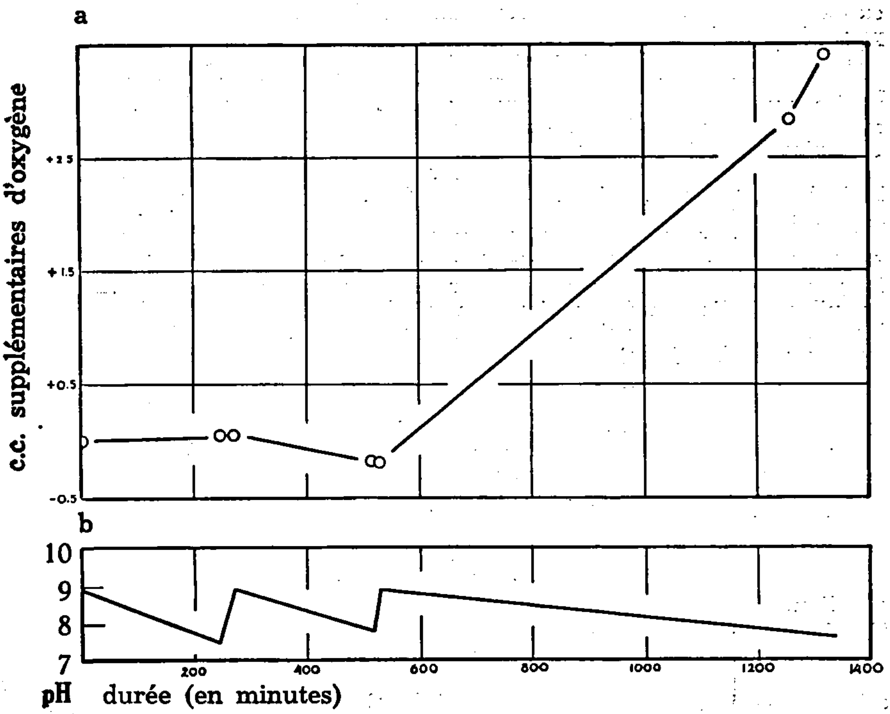
	Durée (minutes)	Essais sur l'amino-acide				Essais-témoins		
		A	B	C	Moyenne	D	E	Moyenne
	245	6,61	6,75	6,53	6,63	6,52	6,62	6,57
	25	0,66	0,68	0,65	0,66	0,65	0,66	0,66
	245	6,10	6,01	5,98	6,03	6,15	6,34	6,25
	20	0,49	0,48	0,48	0,48	0,49	0,51	0,50
	725	16,24	15,76	16,18	16,06	12,81	12,37	12,03
	60	1,97	2,02	2,11	2,03	1,64	1,27	1,46
Total	1320	32,07	31,70	31,93	31,89	28,26	27,77	28,47

Quand on compare le total des mesures, effectuées sur les essais contenant l'amino-acide, et le total des mesures, faites sur les témoins, on remarque pour les premiers une différence de 1%, et pour les seconds une différence de 2%. Les différences d'activité des pellicules d'une même série étaient donc très faibles.

A partir des données, contenues dans le tableau 4 et le graphique 7, nous pouvons déduire trois conclusions.

La première conclusion complète ce que nous avons dit de l'effet de l'appauvrissement sur la désamination en milieu alcalin. On se rappellera qu'au paragraphe 4b nous avons laissé sans réponse la question de savoir si l'effet que nous y avons décrit doit être consideré comme un effet maximum. Il ne semble pas en être ainsi.

Dans l'essai représenté par le graphique 7 la pellicule n'a été appauvrie préalablement que pendant 2 heures. Il s'en est suivi que la désamination a été différée encore pendant 9 heures, au



Graphique 7.

a. Consommation supplémentaire d'oxygène, pendant la décomposition de l'acide aspartique, exprimée par la différence des moyennes du tableau 4.

b. Modification du pH pendant l'essai.

cours desquelles la consommation d'oxygène, c'est à dire l'appauvrissement, s'est poursuivie dans tous les ballons. Après 9 heures de cet appauvrissement nous avons donc effectué un appauvrissement d'une durée totale de 11 heures. C'est seulement après cet appauvrissement prolongé que la désamination peut commencer en milieu alcalin.

En raison de l'importance de cette question, nous voulons ici examiner encore de plus près si l'augmentation si brusque de la consommation d'oxygène après la neuvième heure de l'essai doit en effet être attribuée exclusivement à la désamination, car on pourrait croire qu'une agitation de 9 heures dans un milieu défavorable à l'existence, représente la limite extrême au delà de laquelle la vie n'est plus possible. Ne devrait-on pas attribuer peut-être la consommation supplémentaire d'oxygène à une

oxydation intensifiée, par suite d'une autolyse de cellules dont le contenu passe dans le liquide extérieur?

L'objection peut être réfutée expérimentalement. Si le contenu cellulaire passe dans le liquide extérieur, on doit pouvoir en retrouver quelque vestige dans celui-ci. Immédiatement après l'arrêt de l'expérience, nous avons donc déterminé l'amino-azote dans tous les ballons. Le résultat des déterminations est le suivant:

	Solution initiale	Solution finale
Dans les essais sur l'amino-acide	4,99 mg	1,87 mg
Dans les essais-témoins	0,00 mg	0,12 mg

Compte tenu de la longue durée (22 heures) des essais, l'augmentation de l'amino-azote dans les essais-témoins est donc même inférieure à l'augmentation que nous avons pu constater pour un essai de 4 heures en milieu alcalin. On doit attribuer ce fait à la circonstance fortuite que les pellicules de ces essais étaient plus jeunes que d'habitude (2½ jours au lieu de 3 à 4 jours).

Première conclusion: dans les pellicules non-appauvries, la désamination est arrêtée complètement en milieu alcalin.

La deuxième conclusion concerne les vitesses de réaction en milieu acide et en milieu alcalin.

La tableau 5 permet de faire une comparaison.

TABLEAU 5.

Concentrations exprimées en millièmes de molécule-grammes d'azote par litre.

Essai suivant le graphique	pH	agitation	concentration initiale	temps entre le début de l'essai et le premier dosage suivant	concentration après la durée indiquée	vitesse (diminution de la concentration par heure)
1	< 7	intermittente	36,1	6 heures	24,1	2,0
7	> 7	continue	35,7	13 heures	12,5	1,8

Les concentrations initiales sont à peu près les mêmes; de ce point de vue les vitesses de réaction sont donc comparables.

Par contre, dans les deux essais indiqués l'agitation a été différente. Nous présentons la vitesse de décomposition en milieu alcalin comme une valeur maxima, parce que cette valeur a été atteinte par agitation continue. Cette même agitation aurait majoré la vitesse, si elle avait été appliquée à l'essai en milieu acide.

Notre mesure de la vitesse en milieu acide n'offre donc pas une valeur maxima. Il s'ensuit d'une part que la vitesse en milieu alcalin est sans aucun doute moindre que la vitesse en

milieu acide; d'autre part, il a été établi par cette expérience que, sous certaines conditions, la désamination se produit en milieu alcalin avec une vitesse appréciable.

La troisième conclusion à déduire du tableau 4 et du graphique 7 se rapporte à la publication de SCHMALFUSZ et MOTHES (1930). Ces auteurs ont constaté une désamidation et désamination rapides en milieu acide, et nous pouvons le confirmer. Mais SCHMALFUSZ et MOTHES ont cru qu'en milieu alcalin, l'Aspergillus est capable seulement de provoquer une désamidation.

Le fait que SCHMALFUSZ et MOTHES n'ont pas pu réaliser de désamination s'explique facilement, car ils n'ont pas appauvri les moisissures. On est surpris de constater que le défaut d'appauvrissement des moisissures puisse entraver aussi complètement la désamination. Pour expliquer ce phénomène, nous formulerons au paragraphe suivant une hypothèse qui sera vérifiée expérimentalement dans le chapitre IV.

§ 9. *L'hypothèse de la „préférence" pour le sucre.*

Suivant SCHMALFUSZ et MOTHES, le pH décide directement et à lui seul de la désamination. On sait qu'un pH défavorable peut de cette façon rendre inactives les préparations d'enzymes. Ces auteurs ont démontré dans leur étude que la désamidation peut être empêchée dans une préparation d'Aspergillus du simple fait d'un pH défavorable. Ils ont admis que le pH était capable d'agir de la même façon également *in vivo*.

Mais cette constatation empruntée à une préparation, ne pourrait être étendue au mycélium vivant que si l'on s'était préalablement assuré de ce que, en milieu alcalin, le pH intérieur répond au pH extérieur, et le phénomène biologique de la perméabilité s'oppose à cette identification (voir par exemple BÜNNING, 1936).

Le fait qu'un pH élevé arrête la désamination dans le seul cas des pellicules *non-appauvries*, nous fait entrevoir que dans les pellicules non-appauvries il y a encore des substances dont la présence rend impossible une désamination. Nous supposerons que ces substances sont les *sucres directement assimilables* du mycélium.

Suivant notre hypothèse l'Aspergillus a une grande *„préférence" pour les sucres* à quelque pH que ce soit. En milieu acide cette préférence ne se manifeste toutefois pas, parce que ce milieu favorise plusieurs formes de métabolisme à la fois. Ce n'est pas le cas lorsque le pH est élevé. La croissance extrêmement défectueuse en milieu alcalin décèle un métabolisme fortement entravé. Il existe toujours une certaine concurrence

entre la décomposition des amino-acides et celle des sucres; elle est accentuée dans des conditions défavorables; dans ces circonstances, c'est la désamination qui tombe.

Cette hypothèse de la préférence pour les sucres correspond bien au fait que la désamination surtout, et la désamidation à un degré moindre, sont entravées par un pH élevé; le fait s'explique en admettant que la désamidation représente une hydrolyse, et que la désamination constitue une oxydation. Les sucres, qui sont toujours dissociés par oxydation, seront donc en concurrence surtout avec le radical amine et moins avec le radical amide de l'asparagine. Nos suppositions trouvent un appui dans les graphiques 2 et 3 de SCHMALFUSZ et MOTHES. On y constate que l'asparagine, en milieu acide, est attaqué dès le début de l'essai; par contre, en milieu alcalin l'asparagine reste intacte pendant les quatre premiers jours.

Notre hypothèse peut expliquer ce retard de la façon suivante:

1° aux deux pH, la consommation de sucre commence dès le début de l'essai.

2° en milieu acide, qui est favorable au déploiement de toute l'activité de la moisissure, la consommation du sucre va de pair avec la désamination et la désamidation; une préférence, s'il y en a une, ne se manifeste pas facilement.

3° en milieu alcalin, la moisissure se développe mal. Les réactions du métabolisme ne peuvent plus avoir lieu simultanément, mais se suivent d'après un ordre déterminé et s'achèvent l'une après l'autre.

L'Aspergillus commence par faire une distinction entre le sucre et l'asparagine.

Au commencement, seule la matière préférée est consommée. Ce sont les sucres. Après quatre jours, le sucre est à peu près complètement consommé, et c'est maintenant le tour à l'asparagine. En ce qui concerne celle-ci, la moisissure fait encore une distinction entre la désamination et la désamidation. La teneur en sucre qui a baissé ne constitue plus d'obstacles pour l'hydrolyse du radical amide, tandis que, pour une oxydation marquée du radical amine, la teneur en sucres est encore trop considérable. Le pH défavorable permet donc aux préférences de se manifester dans tous leurs détails et dans un ordre fixe.

L'hypothèse de la préférence pour le sucre est susceptible d'une démonstration expérimentale. Il s'agit essentiellement des deux points suivants:

1° Du point de vue de la physiologie végétale, comme du point de vue de la physiologie animale, la désamidation et la désamination sont fondamentalement différentes;

2° La présence de sucre fait se manifester cette différence en empêchant la désamination.

Avant de passer à la description des expériences sur ce sujet, nous croyons qu'il y a lieu de donner une définition physio-

logique plus précise du mot „préférence" qui évoque une interprétation anthropomorphique. A cet effet, nous partons du fait frappant que l'ammoniac, contrairement aux habitudes généralement répandues dans le règne végétal en cas de déficience physiologique en azote et malgré cette déficience, peut rester inutilisée dans une large mesure par l'organisme. L'asparagine n'est donc pas employée comme source d'azote ou l'est dans une mesure extrêmement faible. L'asparagine n'a donc eu d'importance dans nos essais qu'à titre de source de carbone.

Ce que tout organisme cherche essentiellement dans sa source de carbone, c'est de l'énergie. Le mot „préférence" ne veut donc pas dire autre chose que: „le sucre est pour l'Aspergillus une meilleure source d'énergie que l'asparagine".

On pourrait croire que notre problème, posé en ces termes, se réduit à des proportions extraordinairement modestes et qu'il pourrait être résolu par voie chimique. Il suffirait de brûler de l'asparagine et du sucre dans la bombe de Berthelot, pour déterminer dans quelle mesure le sucre est supérieur à l'asparagine comme source d'énergie.

Cette explication néglige le fait qu'une source d'énergie, d'ailleurs excellente, peut rester inutilisée par l'organisme, si elle n'est pas amenée à une forme susceptible de réagir physiologiquement.

C'est ainsi par exemple qu'il n'est pas irrationnel de penser que la désamination est une réaction par laquelle l'asparagine immobile sort de son état d'inertie physiologique. On a constaté, notamment au cours de ces dernières années que les acides dicarboxyliques à 4 atomes de carbone, sont remarquables à ce point de vue (voir SZENT GYÖRGI, 1935).

Dans le chapitre suivant sera examinée l'influence des sucres dans la solution extérieure. S'il est vrai que ce sont les sucres qui inhibent la désamination dans les pellicules non-appauvries, la présence de sucre dans le liquide extérieur doit avoir une grande influence sur le cours de la désamination.

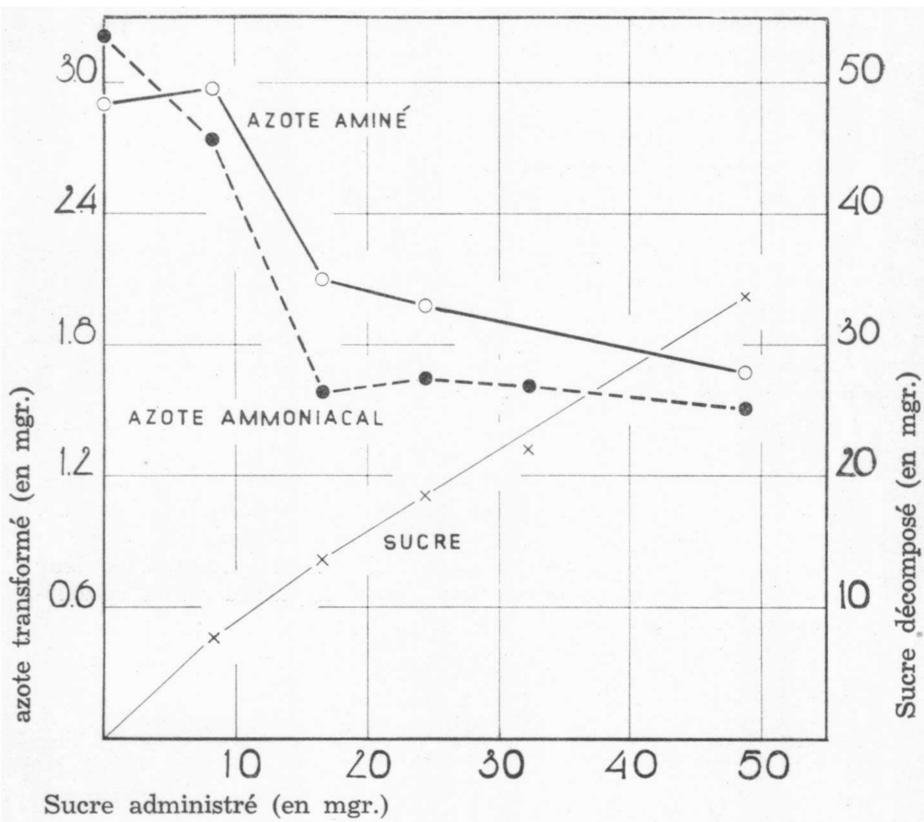
Enfin, une expérience au sujet de la déficience d'oxygène pourra jeter de la lumière surtout sur la nature de la concurrence entre le sucre et l'acide aminé.

CHAPITRE IV

Examen des facteurs qui entravent la décomposition des acides aminés

§ 1. Influence de faibles teneurs en sucre,
   a) en milieu acide
   b) en milieu alcalin.
§ 2. Influence de fortes teneurs en sucres,
   a) en milieu acide
   b) en milieu alcalin.
§ 3. Déficience en oxygène.
§ 4. Discussion des résultats.

Graphique 8.



§ 1. *Influence de faibles teneurs en sucre.*

a) *En milieu acide.*

On a maintenu les pellicules pendant 4 heures sur une solution d'acide aspartique (concentration N/50) à laquelle on a ajouté diverses quantités de sucre. Le pH initial qui était de 3,6 a peu changé pendant l'essai. Volume de la solution 37 cc.

Du graphique 8, on déduit une première conclusion, celle que l'effet d'inhibition du sucre ne commence pas avant qu'il y ait plus de 8 mg. de sucre présent dans les 37 cc usuels du liquide.

L'inhibition relativement la plus considérable a lieu entre 10 et 15 mg. de sucre dans le liquide, c'est à dire à une concentration de N/2000 à N/1500. Dans le graphique, l'inhibition sur ce trajet s'exprime par une descente très abrupte de la courbe; on peut expliquer le caractère abrupte de cette descente par les chiffres relatifs à la consommation de sucre sur ce trajet. Chaque milligramme de sucre peut contribuer ici à faire descendre plus fortement la ligne parce que, pendant la durée de notre expérience, chacun de ces milligrammes offerts aux pellicules peut être consommé sur ce trajet. Mais si la concentration initiale surpasse N/1500, il se trouve au moment de l'arrêt de l'expérience encore un reste de sucre; aussi, l'effet de la concentration en sucres, est-il alors relativement plus faible. Dans des expériences de comparaison, nous avons continué la ligne du graphique et en augmentant la concentration en sucre nous avons constaté que la diminution ultérieure de la désamination est aussi constante que faible.

En l'absence du sucre, on trouve de nouveau plus d'ammoniac que la quantité correspondant à l'amino-azote disparu, mais dès qu'on atteint les 8 mg. de sucre, ce rapport se renverse, de sorte que sur le graphique 8 les deux courbes se coupent immédiatement après le début, en se continuant ensuite sensiblement parallèles. Le fait que ces lignes s'intersectent, traduit le rôle physiologique double de l'acide aminé:

Au-dessus de l'intersection, l'acide aspartique est traité comme une simple source de carbone, le sucre venant à manquer; la moisissure se débarrasse entièrement de l'ammoniac formé comme sous-produit;

Au-dessous de l'intersection, la moisissure trouve dans le sucre une bonne source d'énergie; contrairement à ce que nous avons trouvé plus haut, l'amino-acide est maintenant traité comme source d'azote; la moisissure retient autant d'ammoniac qu'il faut pour la synthèse d'albumine. Le rythme activé du renou-

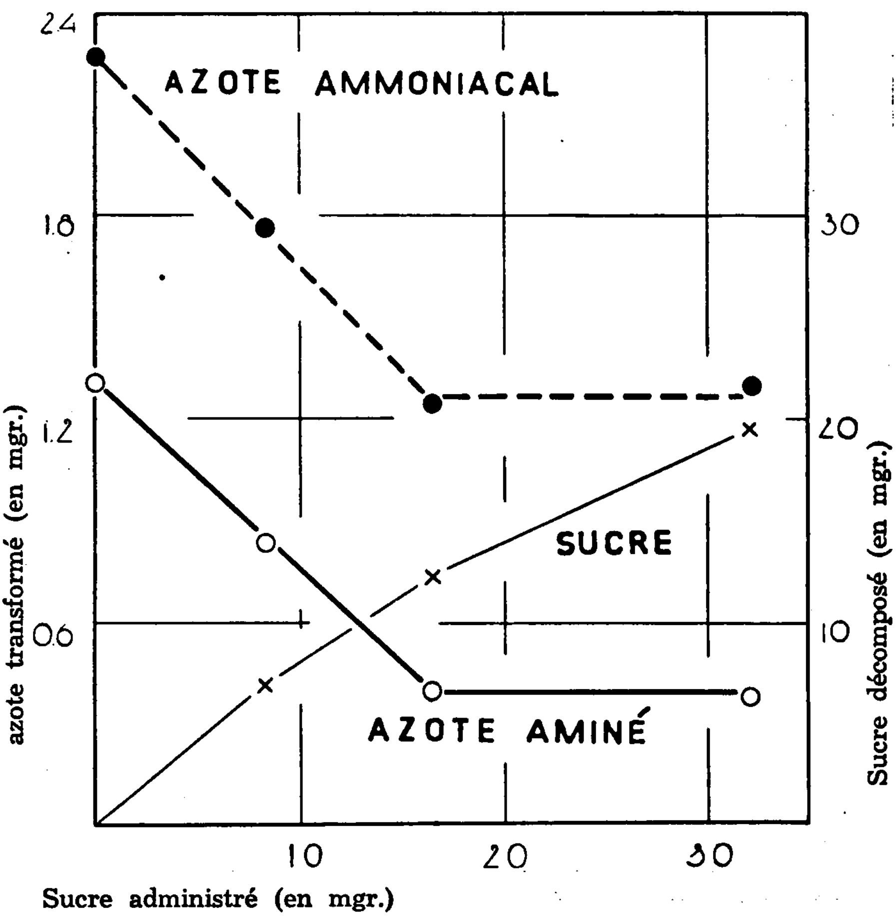
vellement de protoplasme amène ici l'abaissement de la courbe de l'ammoniac.

b) *En milieu alcalin.*

Après le résultat inattendu décrit plus haut, nous avons abordé l'étude de l'influence du sucre en milieu alcalin des deux points de vue suivants:

1° D'après notre hypothèse, la désamination doit être inhibée plus fortement qu'en milieu acide et nous nous attendons donc

Graphique 9.



à constater dans le graphique que la courbe se trouvera *plus bas;*

2° Nous nous attendons à constater que la moisissure réagira sur des teneurs en sucre encore plus faibles, de sorte que la courbe descendra *plus tôt* que dans le graphique 8.

Le graphique 9 montre que l'expérience a confirmé nos deux suppositions. Acide aspartique, concentration N/100; volume de la solution 37 cc.

Au cours de cette expérience, le pH est descendu légèrement: de 8,0 à 7,8, ce qui s'explique par la production d'acides.

On peut attribuer la désamination, du reste très faible, dans la partie horizontale de la courbe, à une acidification locale. Il est probable que par l'application de toutes les précautions dont nous disposons, on pourra empêcher complètement la désamination. Mais le but de cette expérience n'était pas tant de déterminer la limite inférieure pour la désamination que d'obtenir des indications expérimentales à l'appui de notre hypothèse.

Il est à remarquer que, pour le milieu alcalin, les courbes de l'azote aminé et ammoniacal ne se coupent pas malgré la présence du sucre, et qu'elles ne se rapprochent pas l'une de l'autre. L'allure parallèle de ces courbes indique que l'excès d'ammoniac est remarquablement constant; cet excès resulte du métabolisme basal, sans que la présence des sucres intervienne aussi peu que ce soit dans ce métabolisme.

On pourrait croire que le graphique 9 contredit l'explication que nous avons donnée de l'inversion des courbes du graphique 8. Pourquoi ne se forme-t-il pas, aux dépens de l'excès d'ammoniac et à l'aide du sucre, un supplément de nouveau protoplasme?

A cette objection, on peut répondre en faisant la distinction entre l'influence du métabolisme basal et celle du pH. La courbe de l'ammoniac située à un niveau élevé dans le graphique 9 démontre l'effet du métabolisme basal. Mais l'intersection des courbes dans le graphique 8 ne signifie pas que le métabolisme basal soit refoulé en milieu acide. Les faibles teneurs en sucre en sont incapables quel que soit le pH. Le métabolisme basal se poursuit sans faiblir dans les deux milieux, mais en milieu acide il ne peut plus se manifester, parce qu'une nouvelle fonction vitale entre en jeu: *la croissance.* Au-dessus de l'intersection en milieu acide, il n'y a pas de croissance parce qu'il n'y a pas de sucre. Dans l'essai du graphique 9, il n'y a nulle part de croissance parce que le pH est défavorable. On n'ignore pas que l'Aspergillus ne croît plus lorsqu'on le transplante dans un milieu alcalin. L'inhibition de la croissance est compatible avec une

consommation de sucre telle que celle qui a été enregistrée sur le graphique 9. Dans les circonstances indiquées le rythme du métabolisme des hydrates de carbone se trouve accéléré dans chaque cellule, sans qu'il se produise une *multiplication des cellules.* La preuve en est qu'en milieu alcalin il n'y a jamais d'augmentation appréciable du poids de matière sèche; une légère diminution de poids, c'est même la règle générale pour ce milieu.

L'allure et le rapport des courbes entre elles sur les graphiques 8 et 9, démontrent une influence variable des trois facteurs analysés, l'un sur l'autre: le métabolisme basal, la croissance et le pH qui, chacun à leur tour, prédomine sur les autres.

§ 2. *Influence de fortes teneurs en sucre.*

a) *En milieu acide.*

Le tableau 6 montre l'effet de la présence de 5% et 20% de sucre dans ce milieu.

TABLEAU 6.

Rapport	Sucre %	Azote ammoniacal	Azote aminé	
			mg.	%
A	0	+ 7,23	— 4,73	— 42
B	5	+ 3,06	— 2,81	— 25
C	20	+ 1,64	— 2,78	— 25

En pourcentages, ces résultats sont équivalents au freinage pour de faibles teneurs en sucre. Si nous comparons superficiellement les résultats — il ne s'agit ici que d'ordres de grandeur — l'activité est diminuée de moitié environ dans les deux cas B et C. Une teneur en sucre de 20% produit donc le même effet sur la désamination qu'une teneur en sucre de 5%. On peut même prétendre qu'une solution de sucre à 0,03%, produit en principe le même effet qu'une solution 700 fois plus concentrée. Que l'utilisation de l'acide aminé diminue en présence du sucre, ce n'est pas pour étonner les physiologistes. Mais la seule chose remarquable que nous trouvions au cours de cette expérience, c'est la grande indépendance de la teneur en sucre.

Pour se faire une idée de cette sélectivité préférentielle pour le sucre en défaveur de l'acide aminé, on pourrait tenter l'explication suivante: le potentiel d'oxydo-réduction pour la respiration des sucres, pourrait être une autre que celle qui est exigée pour l'oxydation de l'acide aminé. Il se peut qu'on doive attri-

buer la préférence pour le sucre au fait que le potentiel d'oxydo-réduction de la cellule se prête plus facilement à l'oxydation du sucre qu'à l'oxydation de l'acide aminé.

b) *En milieu alcalin.*

L'expérience doit être conduite avec le plus grand soin pour maintenir le pH constant. Celle qui sera décrite dans ce qui suit a été organisée de manière que pour chaque flacon on a prévu, outre le témoin, encore trois flacons qui furent employés pour en prélever, à des intervalles determinés, 1 cc de liquide pour la détermination du pH. Les essais préliminaires avaient montré qu'on doit procéder à la première rectification du pH dès le premier quart d'heure après la mise en train. Quant aux rectifications suivantes on peut prendre les intervalles successivement plus longs et, au total, pendant les quatres heures de l'essai, six rectifications suffisent. Le moment et la quantité de l'addition de lessive de soude ont été choisis à la suite d'une trentaine de déterminations du pH, exécutées dans les flacons réservées ad hoc. A de très brefs intervalles (10 minutes ou moins) on a agité les flacons. La plupart du temps le pH était de 8, avec des écarts de très courte durée vers 7,9 et 8,2. Les résultats sont consignés dans le tableau 7.

Influence du sucre sur la désamination dans des pellicules jeunes (A et C) et vieilles (D et E).

TABLEAU 7.

Rapport	Solution nutritive					Pellicule de moisissure			
	Sucre		Azote Ammoniacal	Azote aminé		Age	Sucre	Azote Ammoniacal	Azote aminé
	Teneur	Consommation		mg.	%	Heures			
A	0%	0 mg.	1,65	— 1,86	— 15	54	—	0,03	+ 0,11
C	5%	130 mg.	0,25	+ 0,63	+ 5	54	25,9	0,61	— 0,88
D	0%	0 mg.	2,06	— 1,91	— 15	78	8,7	1,71	— 1,18
E	5%	110 mg.	0,39	— 0,21	— 1	78	58,5	0,36	+ 2,16

Les essais préliminaires ont montré que du point de vue quantitatif, des différences importantes peuvent se manifester suivant qu'on travaille avec des pellicules plus vieilles ou plus jeunes. Les pellicules de 54 heures (A et C) proviennent de la même série que les pellicules de 78 heures (D et E). Dans le tableau 7 les chiffres relatifs à l'azote aminé dans le liquide ont une importance capitale. En l'absence de sucre, nous constatons une diminution de 15% et en sa présence une diminution de 1%

seulement ou même une augmentation d'amino-azote. Cette augmentation est un phénomène passager qui se constate surtout en milieu alcalin [1]). Si nous supposons que ce même phénomène se produit également et aux mêmes proportions dans les solutions exemptes de sucre, il est clair que nous pouvons considérer une inhibition de 15% comme un minimum; or, en réalité la différence se rapproche plutôt de 20%.

En étudiant l'azote aminé non seulement dans le liquide extérieur, mais aussi dans l'intérieur du mycélium, on obtiendra une représentation complète du sort de l'azote aminé (voir le tableau 8).

TABLEAU 8.

	Rapport	Sucre	Diminution ou augmentation de l'azote aminé		
			Dans le liquide	Dans le mycélium	en total
Pour la pellicule jeune	A	0%	—1,86	+0,11	= —1,75
	C	5%	+0,63	—0,88	= —0,25
Pour la pellicule vieille	D	0%	—1,91	+1,18	= —0,73
	E	5%	—0,21	+2,15	= +1,94

Nous constatons ici en premier lieu qu'en absence de sucre, la consommation de l'acide aminé des pellicules jeunes (A) est supérieure au double de celle des pellicules plus vieilles (D). On constate en outre qu'en présence de sucre la diminution du total de l'azote aminé est négligeable dans les pellicules jeunes (C) et qu'elle est nulle pour les pellicules vieilles (E). Nous ne constatons donc de décomposition d'amino-acide qu'en absence du sucre. Ce résultat établit expérimentalement l'exactitude de notre façon de voir: que la désamination par la moisissure est complètement arrêtée lorsque la moisissure se trouve en milieu alcalin en présence du sucre.

[1]) Le caractère passager d'une augmentation de l'azote aminé dans le liquide nutritif nous est fourni par le graphique 3 de SCHMALFUSZ et MOTHES. Ils ont noté aprés:
100 heures une diminution de 1% d'azote aminé dans le liquide;
140 heures une diminution de 10%, et
160 heures une diminution de 8%.
Entre 140 et 160 heures, il y a donc une augmentation de 2%.
Entre 160 et 300 heures, la diminution n'est plus interrompue par une augmentation.

§ 3. *Déficience d'oxygène.*

Le tableau 9 permet d'établir une comparaison entre les activités des pellicules sans et avec la solution usuelle d'asparagine, suivant qu'elles se trouvent dans l'air atmosphérique à 20% d'oxygène, ou dans de l'azote complètement exempt d'oxygène. Dans ce dernier cas, on doit prendre aussi la précaution de débarrasser d'oxygène la solution nutritive, afin d'obtenir un résultat bien net.

TABLEAU 9.
Influence de l'oxygène sur la désamination.

	Solution	Milieu	Azote ammoniacal		Azote amidé			Azote aminé		
			Début	Fin	Début	Fin	Diminution	Début	Fin	Diminution
A	Eau	Air	0,0	1,2	—	—	—	0,0	0,0	—
B	Asp.	Air	0,1	4,6	7,5	5,9	21%	8,9	6,5	27%
C	Eau	Azote	0,0	0,7	—	—	—	0,0	0,2	—
D	Asp.	Azote	0,1	2,1	7,5	6,1	19%	8,9	8,9	0%

Cet essai démontre aussi que la désamination et la désamidation sont deux processus essentiellement différents. La circonstance que les moisissures respirent à l'air ou dans l'azote n'influe visiblement que peu ou pas du tout sur la désamidation.

Il ressort du tableau 9 que la désamination est essentiellement dépendante de la présence d'oxygène. Au cours du chapitre VI nous espérons montrer en détail que la désamination marche de pair avec la consommation d'oxygène; or, une désamination qui est liée à la *présence* et à la *consommation* de l'oxygène est une désamination par oxydation. Ainsi se trouve expérientalement démontré le bien fondé du principe exposé à la page 668.

§ 4. *Discussion des résultats.*

Pour finir ce chapitre, nous voulons aboutir à un schéma simple dans lequel nous voulons résumer tous les comportements de l'Aspergillus qui ont été traités dans ce chapitre et dans le chapitre précédent.

Du chapitre III, nous avons tiré la conclusion que la désamination n'est pas simplement fonction du pH. Le principe qui se formule:

$$\text{pH} < 7, \text{ décomposition,}$$
$$\text{pH} > 7, \text{ pas de décomposition,}$$

est donc sujet à caution.

Du chapitre IV nous avons tiré la conclusion que la désamination ne peut pas être réglée simplement par la présence de sucres. Pour la désamination, on ne peut donc pas poser un principe absolu tel que:

absence de sucre, désamination,
présence de sucre, pas de désamination.

Les quatres facteurs pH > 7, pH < 7, présence de sucre et absence de sucre sont chacun pris à part, capable de varier dans une mesure plus ou moins grande la désamination, tandis que des quatres combinaisons possibles de ces facteurs une seule est capable d'arrêter complètement la décomposition, à savoir pH > 7, en présence de sucres.

Ensuite, la présence de l'oxygène est une condition nécessaire pour la désamination, indépendamment du pH et des sucres; dès lors nous disposons de quelques principes bien définis qui s'appliquent à notre problème.

Il se trouve que le besoin d'oxygène constitue le caractère propre de la désamination et s'y applique d'une façon générale. En effet on le constate également pour les bactéries (Janke et Tayenthal, 1937) et pour des tissus animaux (Krebs 1933a).

L'effet combiné du sucre et du pH est — pour autant qu'il est connu actuellement — caractéristique pour les objets végétaux. Pour les objets animaux, on n'a encore jamais rien constaté à ce sujet. On peut trouver quelques fragments relatifs à cet effet dans la bibliographie botanique. C'est ainsi que Butkewitsch (1903) a déjà constaté qu'en présence de sucres l'Aspergillus ne dégage pas d'ammoniac dans le liquide nutritif aux dépens de la peptone. Cependant son résultat est entièrement différent du nôtre, car:

1° Butkewitsch démontre que le processus de formation de l'ammoniac n'était pas, à proprement parler, arrêtée; la solution ne contenait pas d'ammoniac parce que celui-ci, quoi qu'il fût produit, était simplement absorbé dans la formation de l'albumine;

2° Il est probable que dans ses essais, l'ammoniac était fourni par des amides, l'auteur ne faisant pas de distinction entre l'azote amidé et aminé;

3° un effet combiné du pH et du sucre ne pouvait pas être mis en lumière parce qu'on n'a prêté aucune attention au pH.

Nos résultats se rapprochent plutôt du travail de Blanchetière (1917), là ou il parle par exemple „d'une action retardatrice très nette des sucres fermentescibles". Mais pour le Bactérium fluores-

cens les conditions sont tout à fait différentes. Pour cet organisme un pH > 7 est favorable et un pH < 7 défavorable. Partant du fait que les sucres acidifient le milieu, l'auteur arrive à identifier complètement l'effet du sucre avec celui du pH et à attribuer à ce dernier le rôle de facteur décisif unique. En parlant de la fonction amine de l'asparagine, il dit par exemple:

„L'hydrolyse de cette fonction azotée paraît due à une enzyme spéciale agissant en milieu alcalin, mais dont l'action est inhibée par les acides". Le défaut de précision de ses indications doit être attribué à la durée excessivement longue de ses essais et à la circonstance que bien qu'il fasse en principe une distinction (d'ailleurs inexacte) entre l'azote amidé et aminé, il ne détermine ni l'un ni l'autre expérimentalement, mais fonde son analyse sur les dosages de l'ammoniac qui ne permettent qu'imparfaitement d'analyser les processus.

Du point de vue bactériologique un plus grand nombre de travaux existe sur l'influence du sucre et du pH sans pourtant rapprocher les deux points de vue; on en trouve les références chez JANKE (1930) et HEIGENER (1935). La seule publication abordant le problème du point de vue botanique, et où une influence du sucre est nettement montrée, est celle de KOSTYTCHEW et TSWETKOWA (1910). Mais il n'y a pas lieu d'insister sur les points de comparaison entre cette publication et la nôtre, du moment que ces auteurs ont travaillé avec des nitrates et non pas avec des acides aminés et qu'en outre ils n'ont pas examiné l'influence du pH.

La constatation de l'effet combiné du sucre et du pH est sans doute d'une certaine importance, si l'on veut introduire de l'ordre et de la régularité dans notre problème, mais elle ne fournit pas une interprétation vraiment satisfaisante du métabolisme des acides aminés dans les végétaux. Les résultats rapportés ici ont moins le caractère d'une explication, qui nous amène au fond des phénomènes, que celui d'une recette pour provoquer ou inhiber la désamination.

La question se pose: d'où vient que la présence du sucre n'entrave la désamination qu'à un pH déterminé? Ou bien, au contraire on se demandera: pourquoi le milieu alcalin défavorable, n'est-il pas suffisant à lui seul pour arrêter la désamination? Pourquoi le sucre doit-il être présent en même temps dans ce milieu défavorable?

Pour résoudre ces questions, nous croyons qu'il sera utile d'étendre notre examen sur d'autres moisissures.

CHAPITRE V

Désamidation et désamination par d'autres moisissures

Ce chapitre a pour sujet l'examen de la question si les résultats obtenus au moyen de l'Aspergillus peuvent être étendus à d'autres moisissures. Ce n'est pas notre but d'inventorier systématiquement les différences qui vraisemblablement apparaîtront. Même un examen se limitant à la recherche de la meilleure méthode de culture pour nos moisissures exigerait certainement de nombreuses années. Nous n'avons qu'à renvoyer à l'exemple frappant, apporté par René Vallery-Radot [1]) où il décrit comment la culture de l'Aspergillus niger a pu constituer le chef-d'oeuvre de la vie scientifique de Raulin, élève aussi consciencieux que fidèle de Pasteur.

Nous avons donc fait un choix: on n'a étudié que l'influence des seuls facteurs: pH, sucre et appauvrissement. Une comparaison plus générale précède. Nous recueillons ensuite des données plus détaillées au sujet de chaque moisissure, prise à part.

§ 1. Comparaison des vitesses de réaction.
§ 2. Ascochyta pisi.
§ 3. Mucor racemosus.
§ 4. Fusarium conglutinans.
§ 5. Cylindrocarpon radicicola.
§ 6. Conclusions.

TABLEAU 10.

Décomposition d'asparagine par diverses moisissures pendant 4 à 6,5 heures. Pas d'appauvrissement. Le pH = 5,0. Les concentrations sont indiquées en millièmes de molécule-grammes d'azote par litre et les vitesses en millimolécule-grammes d'azote disparu par heure et par gramme de matière sèche.

	Age de la pellicule (heures)	Dureé de la réac-tion (heures)	Poids de matière sèche	Azote aminé			Azoto amidé		
				Déb.	Fin concentr.	Vi-tes-se	Déb.	Fin concentr.	Vi-tes-se
Aspergillus	80	4	0,58 g.	33,7	25,5	3,5	26,4	18,3	3,5
Cylindrocarpon	240	4	0,59 g.	33,2	24,3	3,8	—	—	—
Fusarium	194	5,5	0,63 g.	32,2	26,4	2,0	24,7	19,9	1,4
Mucor	228	6,5	0,30 g.	33,2	33,6	0,0	24,7	21,8	1,5
Ascochyta	213	6,5	0,12 g.	33,2	33,7	0,0	24,7	20,4	6,0

[1]) La vie de Pasteur. Paris, Flammarion. 1900; p. 270 et suivantes.

§ 1. *Comparaison des vitesses de réaction.*

Nous partons ici encore du point de vue que la désamination et la désamidation se caractérisent le mieux par la vitesse initiale de la réaction. Comme base de comparaison, nous avons pris la vitesse de décomposition par heure et par gramme de matière sèche pour une même concentration initiale (voir tableau 10).

Le tableau 10 montre une différence nette entre le comportement de diverses moisissures en ce qui concerne la désamination et la désamidation. Tous les agents examinés sont capables d'hydrolyser le radical amide de l'asparagine. L'Ascochyta le fait environ deux fois plus rapidement que l'Aspergillus et celui-ci à son tour deux fois plus rapidement que le Mucor et le Fusarium, mais dans une comparaison d'ensemble telle que la présente le tableau 10, il n'y a pas lieu d'attribuer une importance capitale à ces différences.

La constatation que les deux dernières moisissures laissent intact le radical amine est toutefois importante. Si une décomposition quelconque a eu lieu, l'activité en tout cas a été tellement faible, qu'une diminution éventuelle est demeurée cachée par une augmentation simultanée. Nous rappelons ici que le même cas s'est présenté pour l'Aspergillus, mais dans des circonstances entièrement différentes, à savoir en présence du sucre et à un pH $>$ 7. La question se pose maintenant si l'on peut considérer l'inhibition de la désamination comme une qualité propre au Mucor et à l'Ascochyta.

Dans l'examen plus détaillé qui suit, nous nous bornons à des déterminations d'ammoniac et d'azote aminé; c'est que seule la désamination nous inspire de l'intérêt du moment qu'il a été établi par notre comparaison générale, que la désamidation n'offre pas de différences sensibles.

§ 2. *Ascochyta pisi.*

Cette moisissure forme après 160 heures environ, une pellicule d'un seul tenant à couleur verte foncé. Son poids à sec n'a jamais dépassé les 140 milligrammes.

Cette pellicule est extrêmement sensible à l'appauvrissement, car après un séjour de 12 heures sur l'eau le pigment vert foncé a passé au brun jaunâtre. WEHLBURG (1932) décrit le même phénomène qui s'est produit lentement et progressivement dans ses cultures, qui avaient été poursuivies beaucoup plus longtemps que les nôtres. Comme le changement de couleur peut se produire dans les 12 heures, il faut peut-être l'attribuer à la consommation des matières nutritives mobiles du mycélium.

Au moyen de ces pellicules appauvries et décolorées, nous avons pu constater une diminution de l'azote aminé (Tableau 11). On ne peut pas conclure du tableau 11 que l'Ascochyta appauvrie pourrait, contrairement à la non-appauvrie être capable de désaminer l'asparagine à une vitesse mesurable.

Certes, l'azote aminé diminue dans la solution, mais à cette

TABLEAU 11.

Diminution de l'azote aminé (en mg.) dans une solution d'asparagine à trois concentrations différentes, et augmentation de l'azote ammoniacal (en mg.). Volume total 37 cc; pH = 4,0; durée de l'essai 10 heures; appauvrissement des pellicules pendant 12 heures.

	Poids de matière sèche	Azote aminé			Azote ammoniacal		
		Début	Fin	Diminution	Début	Fin	Augmentation
A	0,12 g.	26,5	25,5	1,1	0,6	0,9	0,3
B	0.14 g.	12,2	12,7	0.5	0,3	0,6	0,3
C	0,11 g.	6,6	6,5	0,1	0,2	0,6	0,3

diminution ne correspond pas une augmentation de l'ammoniac. L'augmentation de la perméabilité pour l'asparagine, comme suite de l'élévation de la concentration, constitue déjà une explication satisfaisante de la disparition d'amino-azote dans la solution.

Mais pour pouvoir conclure à une augmentation de la perméabilité, il faudrait établir que le changement de couleur par appauvrissement ne soit pas une manifestation pathologique du protoplasme en train de périr. Nous pouvons écarter cette dernière supposition eu égard aux chiffres se rapportant à l'ammoniac. Si le contenu des cellules en train de se décomposer était passé dans le liquide, on aurait dû trouver *beaucoup plus* d'ammoniac. Cet argument paraît d'autant plus probant lorsqu'on songe qu'une grande quantité d'ammoniac aurait aussi dû être libérée aux dépens du radical amide de l'asparagine. Car nous avons déjà constaté que l'Ascochyta non-appauvrie est tout à fait capable de produire une désamidation en milieu acide. La faible teneur en ammoniac démontre donc que l'azote de l'asparagine est resté intact dans le cas de l'Ascochyta appauvrie. Elle démontre en outre que les cellules sont restées intactes dans le milieu acide.

La teneur en ammoniac n'est pas seulement remarquablement faible, mais elle est aussi remarquablement constante, malgré les teneurs initiales différentes en asparagine. Elle ne peut être

constante que si l'ammoniac provient d'une source commune et, ici également, nous admettons une décomposition par respiration de l'albumine, comme composante temporairement prédominante du métabolisme basal. Mais comme il se dégage peu d'ammoniac au cours du métabolisme basal, on doit admettre qu'au cours de ce métabolisme, d'autres matières, par exemple des graisses, sont oxydées ou bien, — au cas où il s'agit des mêmes substances que chez l'Aspergillus — que l'activité de cette moisissure est en général très faible. Dans le premier cas, l'Ascochyta est impropre à des essais ultérieurs, parce qu'une nouvelle complication se manifeste pour cette moisissure. Dans le deuxième cas, il est impropre à nos fins parce qu'un métabolisme basal faible traduit une activité faible à tout point de vue.

Il semble plus probable que cette dernière hypothèse soit fondée; le développement lent bien connu de l'Ascochyta cadre assez bien avec l'activité faible que nous avons présumée. A la

TABLEAU 12.

Action du Mucor racemosus sur l'acide aspartique à différentes concentrations, à un pH = 5,0; durée de l'essai 9 heures; pellicules appauvries pendant 12 heures.

Poids de matière sèche	Azote aminé (en millimolécule-grammes par litre)			Augmentation et diminution en mg. par flacon (37 cc) calculé sur le même poids de matière sèche	
	Teneur initiale	Teneur finale	Vitesse par heure	diminution de l'azote aminé	Augmentation de l'azote ammoniacal
0,31 g.	17,2	16,3	0,1	0,5	1,2
0,31 g.	8,9	8,0	0,1	0,4	0,9
0,30 g.	5,0	4,2	0,1	0,4	1,2
0,24 g.	2,7	1,8	0,1	0,5	0,9

suite de ces considérations, nous avons passé à l'examen du Mucor racemosus.

§ 3. *Mucor racemosus.*

Pour cette moisissure, on a examiné d'abord l'influence de la concentration du substrat en milieu acide (Tableau 12).

Dans la partie droite du tableau 12, on trouve indiquées les quantitités absolues de l'azote aminé disparu et de l'azote ammoniacal formé. Il en ressort que, dans le cas du Mucor nous

devons tenir compte d'une véritable consommation de l'acide aminé, car on retrouve toujours l'azote aminé disparu à l'état d'ammoniac, augmenté d'un supplément variable.

Comment devons-nous interpréter le fait que la vitesse de réaction est égale pour quatre concentrations différentes?

Pour le Mucor doit entrer en jeu un facteur limitateur spécial, par l'action duquel la capacité maxima de consommation est dépassée, même à la concentration la plus faible.

A priori, il est possible que la manifestation de ce facteur limitateur soit déterminée génotypiquement pour le Mucor. Nous pouvons songer soit à une perméabilité très faible pour l'acide aspartique, soit aux processus de synthèse limitant la consommation de l'acide aminé (par exemple par la formation d'une quantité trop faible d'enzymes).

Il n'est pas vraisemblable que la perméabilité constitue le facteur limitateur car la concentration augmentant, la perméabilité augmente avec elle; or, les concentrations auxquelles nous travaillons, s'écartent si fortement l'une de l'autre qu'un dépassement de la limite maxima, déjà à la concentration la plus basse, n'est guère probable.

Si les processus de synthèse sont d'une façon ou d'une autre le facteur limitateur, nous pourrons rechercher — en examinant la désamination dans des conditions variables du milieu — si la manifestation de ce facteur est fixée héréditairement. Si la vitesse de réaction reste encore constante, le Mucor ne peut pas nous servir dans notre examen, pour le même motif que chez l'Ascochyta: un niveau trop bas du métabolisme.

Mais ce que nous pouvons constater à propos du Mucor en ce qui concerne le métabolisme des hydrates de carbone, semble indiquer le contraire. Après une semaine, il reste encore, dans le cas de l'Ascochyta plus de 1 g. des 5 g. de sucre contenus dans le liquide nutritif; après la même période, il ne reste que 80 mg. dans le cas du Mucor. En tout cas, il y a donc là un métabolisme intense des hydrates de carbone.

En passant nous faisons remarquer que, de la grande quantité de sucre qui a passé par la cellule, très peu a été employé pour former du protoplasme (faible poids de matière sèche). Le Mucor gaspille donc en grande partie le sucre et n'utilise pas beaucoup de sucres pour sa croissance.

Des expériences préliminaires ont montré que le Mucor se développe mieux lorsqu'on ajoute de la craie au fond du flacon. Ceci fait d'abord monter le pH du liquide à 8,0 mais lorsque la durée se prolonge, il peut se manifester un déplacement vers

l'acidité, vers pH = 6,0; mais l'essai sur l'amino-acide est de trop courte durée pour pouvoir faire descendre le pH au dessous de 7,0. Dans le milieu alcalin, les hydrates de carbone sont décomposés en passant par d'autres stades intermédiaires car tous les flacons avaient une odeur pénétrante d'acide butyrique.

Les mêmes expériences préliminaires ont montré que les pellicules non-appauvries étaient plus actives que les pellicules appauvries. Mais comme le sucre dans le mycélium agit favorablement sur la décomposition, il en est probablement de même, lorsque le sucre est présent dans le liquide extérieur. Ceci est confirmé par le tableau 13.

TABLEAU 13.

Influence du sucre sur la désamination à pH > 7; pellicules de moisissures non-appauvries.

	Drée de l'essai (heures)	Sucre ajouté %	Azote aminé			Diminution et augmentation en mg. par flacon (37 cc)	
			Début concentr.	Fin concentr.	Vitesse (par heure)	Diminution l'azote aminé	Augmentation de l'azote ammoniacal
A	19	0	25,9	21,9	0,2	2,1	4,1
B	12	5	24,5	20,7	0,3	2,0	3,8

Ici également il se constate une désamination, car tout l'azote aminé disparu se retrouve à l'état d'ammoniac. Du tableau 13 nous tirons, au sujet de l'intensité du métabolisme des acides aminés, les deux conclusions suivantes:

1° Il se décompose par heure une quantité d'acide aminé deux fois plus grande que celle que nous avions constatée dans l'essai en milieu acide (tableau 12). Ce résultat favorable est dû en partie à ce que les pellicules n'étaient pas appauvries et en partie à un effet favorable du milieu alcalin;

2° En présence du sucre, à un pH élevé et sans appauvrissement, il se décompose trois fois plus d'acide aminé par heure qu'en l'absence du sucre à pH bas et avec appauvrissement des pellicules.

Le résultat principal qui ressort de ce paragraphe est que, pour le Mucor, la décomposition se produit le mieux dans des conditions qui réalisent exactement le contraire pour l'Aspergillus niger.

§ 4. *Fusarium conglutinans var. callistephi.*

Outre les données mentionnées au § 1, nous n'avons pas pu

obtenir avec cette moisissure des résultats constamment reproduisibles qui permettent de continuer notre étude. VAN DER VEEN (1930) a constaté que le Fusarium prospère le mieux à pH = 6,0. Suivant le tableau 10 la comparaison de la désamidation et de la désamination de l'Aspergillus et du Fusarium ne présente dans ce milieu aucune différence essentielle, mais seules des différences graduelles. Mais après quelques mois lorsque nous voulûmes poursuivre l'essai avec le Fusarium, celui-ci ne sembla plus capable comme auparavant de décomposer 20%, mais 4% seulement et au maximum 9% de l'acide aminé. Les causes nous en paraissent obscures [1]).

§ 5. *Cylindrocarpon radicicola.*

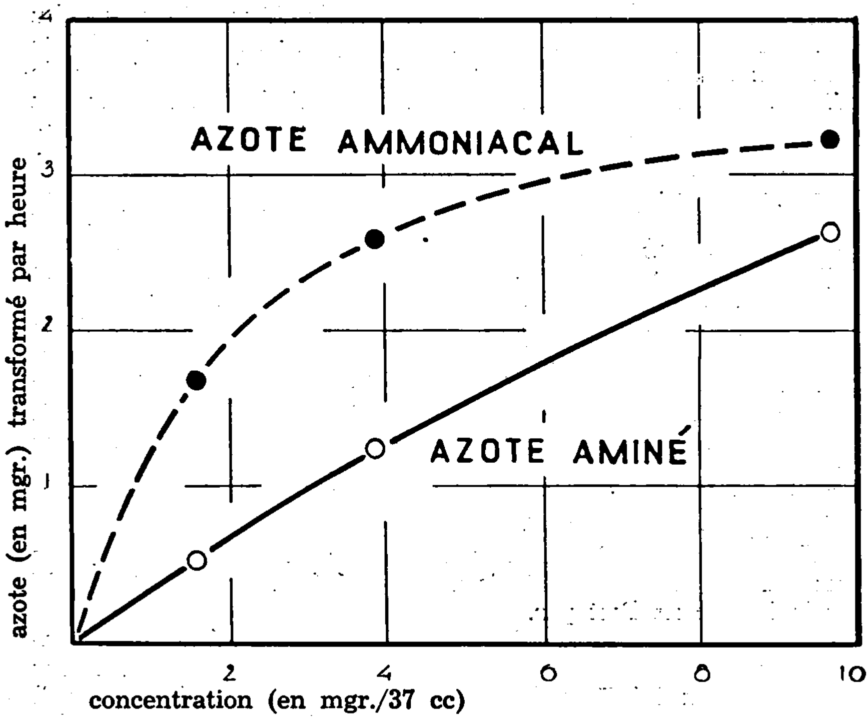
Cette moisissure est équivalente à l'Aspergillus niger en ce qui concerne toutes les propriétés soumises à l'examen. Elle se développe le mieux dans un milieu acide; l'appauvrissement exerce un effet faible sur l'activité dans ce milieu. La désamination débute toujours vigoureusement et s'accentue fortement en fonction de la concentration du substrat, comme le montre le graphique 10.

En l'absence du sucre, la production d'ammoniac correspond toujours à la désamination (voir graphique 10). Pour le Cylindrocarpon il y a, aux concentrations faibles, un excès d'ammoniac plus considérable que pour l'Aspergillus; mais lorsqu' on élève la concentration, la quantité d'ammoniac se rapproche davantage de l'azote aminé total enlevé.

L'inhibition exercée par le sucre à un pH determiné, a été également éxaminée: en milieu acide la désamination est entravée à peu près dans les mêmes proportions que pour l'Aspergillus. Si, à une concentration donnée de l'acide aminé, en l'absence du sucre, il y a décomposition de 27%, ce pourcentage s'abaisse à 17% par la présence du sucre. En présence du sucre la production d'ammoniac diminue de 50%, ce qui nous ramène à l'idée de la synthèse de l'albumine et de la croissance de cellules. La consommation des hydrates de carbone est moins active dans le cas du Cylindrocarpon que dans celui de l'Aspergillus, car après 240 heures il reste encore environ 1% de la solution de sucre, dans laquelle on a cultivé les pellicules, tandis qu'avec l'Aspergillus tout est généralement consommé après 100 heures environ. Les comparaisons faites ici entre l'Aspergillus et le Cylindro-

[1]) Le professeur WESTERDIJK nous signale que l'activité du Fusarium diminue généralement lorsqu'on cultive cette moisissure toujours dans le même milieu nutritif. Cela semble avoir été le cas ici.

Graphique 10.



Influence de la concentration de l'acide aspartique sur la quantité (en mg) décomposée en 5 heures. pH = 5,5. Les moisissures ont été appauvries pendant 12 heures.

carpon se rapportent à des pellicules dont le poids de matière sèche est à peu près égal (voir par exemple le tableau 10).

§ 6. *Conclusions.*

Le problème que nous avions laissé sans solution à la fin du chapitre précédent, nous l'abordons ici dans les termes suivants: quel est le rapport entre la consommation de l'acide aminé et celle des hydrates de carbone?

Cette question sera traitée expérimentalement avec plus de détails au chapitre VI. Mais avant d'aborder ces expériences, nous tenons à tirer du chapitre V certaines conclusions, nous permettant de déduire des indices et des arguments qui pourront servir de fil conducteur à l'examen expérimental plus appro-

fondi en ce qui concerne l'Aspergillus.

Pour la comparaison du métabolisme de l'Aspergillus et celui du Cylindrocarpon et du Mucor notre point de départ a été le suivant: le génotype de ces moisissures détermine le niveau de l'intensité du métabolisme des acides aminés, mais le milieu peut déterminer l'arrêt ou le déclenchement de la désamination. De ce dernier point de vue, les moisissures sont donc comparables.

Au sujet de l'influence du milieu, nous avons maintenant la donnée expérimentale suivante: le Cylindrocarpon réagit sur le sucre de la même façon que l'Aspergillus, tandis que la présence du sucre produit sur le Mucor l'effet contraire à celui qui se produit sur l'Aspergillus. De même le Mucor réagit sur une élévation du pH d'une manière qui est exactement l'opposé du comportement commun à l'Aspergillus et au Cylindrocarpon.

Lorsque, dans des conditions contraires, les même phénomènes se produisent, et lorsque dans des conditions égales il se produit des phénomènes opposés, on peut conclure que ces conditions ne régissent pas *directement* ni par elles-mêmes les phénomènes. Nous arrivons donc aux mêmes conclusions qu'au chapitre précédent, mais par une voie toute différente.

Nous pouvons même faire un pas plus en avant: l'Aspergillus est sensible à une combinaison déterminée du sucre et du pH et le Mucor ne l'est pas.

Appliquons maintenant à la combinaison elle-même, le raisonnement que nous avions appliqué au sucre et au pH en tant que les deux éléments de la combinaison. Car ici également, il est de nouveau question de conditions égales provoquant des phénomènes différents et vice versà. Ceci signifierait donc qu'une combinaison déterminée du milieu est décisive pour la désamination par l'Aspergillus, mais que cette combinaison ne décide pas *directement,* comme *agent direct* de la désamination.

En effet, si le pH n'intervient pas du fait seul de la présence d'un substrat assimilable, on suppose qu'il intervienne à un stade plus éloigné, dans une phase subséquent à la présence du substrat, c-à-d dans sa *transformation* même.

Deux possibilités se présentent:

1° le pH influence la décomposition de l'acide aminé par l'intermédiaire de la décomposition des hydrates de carbone;

2° le pH influence directement la décomposition de l'acide aminé.

Quant à cette dernière hypothèse, nous savons déjà que pour l'Aspergillus, le pH n'empêche pas la désamination proprement dite. Dès lors le choix se limite entre une influence directe du

pH, soit sur la décomposition de la chaîne carbonique des acides aminés, soit sur la décomposition des sucres. Les deux hypothèses sont plausibles. On a constaté déjà plusieurs fois que, dans la décomposition des sucres, une modification de pH conduit la décomposition en la faisant passer par d'autres produits intermédiaires. Il pourrait se produire ainsi un corps qui arrête la dissociation de l'amino-acide. Il se pourrait aussi que le pH modifie les produits intermédiaires de la chaîne carbonique de l'amino-acide et engendre un produit qui, régulièrement, est déjà engendré à partir du sucre. Une accumulation éventuelle de ce produit aurait pour résultat que se trouve entravé ce mode de transformation, d'où résulte la libération de moins d'énergie; par suite de cette concurrence, la décomposition de l'acide aminé est supprimée.

Pour aborder ce problème, il importe avant tout de savoir jusqu' à quel point la molécule d'acide aspartique est dissociée par l'Aspergillus à des pH différents. C'est là le sujet du chapitre VI.

CHAPITRE VI

Consommation par respiration de la chaîne carbonique de l'acide aminé

§ 1. But et dispositif opératoire des recherches.
§ 2. Consommation par respiration de l'acide aspartique.
  a) en milieu acide,
  b) en milieu alcalin.
§ 3. Consommation par respiration de l'acide oxalo-acétique.
§ 4. Conclusions.

§ 1. *But et dispositif opératoire des recherches.*

Dans ce qui précède nous nous sommes demandés de quelle façon la décomposition de la molécule d'acide aminé est influencée par le pH. Une réponse définitive à cette question ne peut être donnée que par isolation et identification des produits intermédiaires de la molécule désaminée. Mais le problème des produits intermédiaires s'est soustrait à toute attaque de la part des botanistes. Si loin est-on d'une solution satisfaisante, qu'on ignore même combien d'atomes d'oxygène sont utilisés pour effectuer, au cours de la respiration, l'oxydation d'une molécule d'acide aminé. La formule de l'acide aspartique permet de sup-

poser que, pour l'oxydation complète de sa molécule, six atomes d'oxygène sont nécessaires:

$$COOH.CHNH_2.CH_2.COOH + 3\ O_2 \rightarrow 4\ CO_2 + 2\ H_2O + NH_3$$

De cette réaction hypothétique le dernier produit seul est connu. Dans la cellule l'oxydation est-elle poussée jusqu'à la formation de l'anhydride carbonique et de l'eau? Pour déterminer la quantité d'oxygène nécessaire pour la décomposition d'une certaine quantité d'acide aspartique (x mg., c'est à dire $\frac{x}{133}$ millimolécule-grammes) nous mesurons l'absorption d'oxygène par la pellicule de moisissure pendant la décomposition de l'amino-acide.

Cet oxygène est consommé dans l'oxydation de l'acide aspartique et dans le métabolisme basal de la pellicule. Dans les flacons-témoins où on n'a pas ajouté d'acide aspartique, l'oxygène a été consommé uniquement par suite du métabolisme basal.

Supposons que dans l'essai sur l'acide aminé il ait été consommé y cc d'oxygène de plus que dans l'essai-témoin, il doit y avoir eu dans l'oxydation de $\frac{x}{133}$ millimolécule-grammes d'acide aspartique une absorption de $\frac{y}{22,4}$ millimolécule-grammes d'O_2. Pour la consommation par respiration d'une molécule d'acide aspartique, il a donc été absorbé $\frac{133}{x}\ \frac{y}{22,4}$ molécules d'oxygène, c'est à dire $11,88\ \frac{y}{x}$ atomes d'oxygène.

Le schéma de notre essai est très simple, la réalisation pratique ne l'est pas. Pour qu'elle se fasse, il faut que trois conditions soient remplies. Deux de ces conditions seront examinées ici-même.

En premier lieu, on doit laisser se poursuivre la réaction jusqu'à ce qu'on soit absolument sûr que tout l'amino-acide a été consommé.

Il faut donc que — la réaction finie — le liquide soit exempt d'azote aminé. Mais cela ne suffit pas. Après une désamination complète, il peut s'y trouver encore des produits intermédiaires non encore décomposés, mais susceptibles de l'être. Dans ce cas, l'absorption d'oxygène dans l'essai sur l'acide aminé ne sera pas encore égale à celle qui se fait dans l'essai-témoin. On poursuivra donc l'essai jusqu'à ce que ces absorptions soient égales. Pour être sûr que la réaction soit finie, il faut donc que le métabolisme basal dans l'essai sur l'amino-acide soit égal au métabolisme basal du témoin.

Mais on a constaté que le métabolisme basal de pellicules de la même série diffère parfois considérablement. Pour nos essais où nous avons toujours comparé le métabolisme basal de plusieurs pellicules, les différences individuelles entre les pellicules sont très importantes.

Ces différences sont inévitables. KOSTYTCHEW (1920) par exemple signale qu'au cours de la culture, il peut se produire des différences, du fait que les flacons de cultures sont fermés par des bouchons de ouate de densité différente; c'est que dans ces conditions les échanges de gaz qui doivent se produire à travers les bouchons de ouate, diffèrent sensiblement. FÜRTH et LIEBEN (1922), ont beaucoup insisté sur l'importance d'échanges de gaz réguliers. L'effet favorable de l'agitation doit selon eux, être attribué à un meilleur apport d'oxygène. C'est surtout la présence de l'anhydride carbonique qui rend plus difficile l'apport d'oxygène aux cellules. On pourrait citer encore plusieurs causes de différences. Notre expérience en ce qui concerne l'influence du pH sur le métabolisme basal, indique qu'il ne faut pas songer ici exclusivement à des différences qui se produisent au cours même des cultures.

La deuxième précaution qu'exige la réalisation de notre schéma, regarde l'élimination des différences du métabolisme basal. C'est pourquoi, avant le commencement de tout essai, nous avons déterminé séparément le métabolisme basal dans chacune des pellicules. Pour éviter les modifications du pH au cours de chacun des essais préliminaires, nous avons employé au lieu d'eau stérile une solution-tampon au phosphate, dont le pH était le même que celui de l'essai à faire.

Le plus souvent, on a divisé en deux groupes, suivant leur métabolisme basal, les cinq pellicules examinées. Dans notre expérience du 28 septembre 1937, nous avons constaté par exemple les absorptions suivantes d'oxygène dans l'essai préliminaire (durée 150 minutes).

A. 2,81
B. 2,76
D. 2,62
C. 2,69
E. 2,65

A et B sont comparables; pour l'essai proprement dit, nous avons ajouté de l'acide aspartique au flacon A tandis que B nous a servi de témoin pour l'essai A. Les essais C, D et E sont comparables également. On n'a pas ajouté d'acide aminé pour l'essai

E qui a servi de témoin pour les essais sur l'acide aminé C et D.

Dans un cas moins favorable, on peut rencontrer trois groupes; par exemple le 24 août 1937, nous avons constaté le métabolisme basal suivant au cours des essais préliminaires (durée 250 minutes):

A. 5,29
B. 4,71
C. 4,70
D. 5,25
E. 4,36

Nous avons ajouté l'acide aspartique au flacon D qui sert de témoin au flacon A. Nous avons agi de même pour les essais B et C; le flacon E tombe.

La détermination du métabolisme basal avant et après l'essai sont d'utiles précautions pour vérifier *la fin* de la décomposition. Mais il est plus important encore d'examiner si le métabolisme basal dans l'essai sur l'amino-acide et celui du temoin diffère *au cours* de la réaction. Car si le métabolisme basal se modifiait par l'alimentation même à l'acide aminé, nous ne pourrions tirer aucun profit de la constation que les pellicules sont comparables avant et après la réaction.

Pour préciser ce point nous le discuterons en détails au paragraphe suivant en nous reportant à un exemple concret.

§ 2. *Consommation par respiration de l'acide aspartique.*

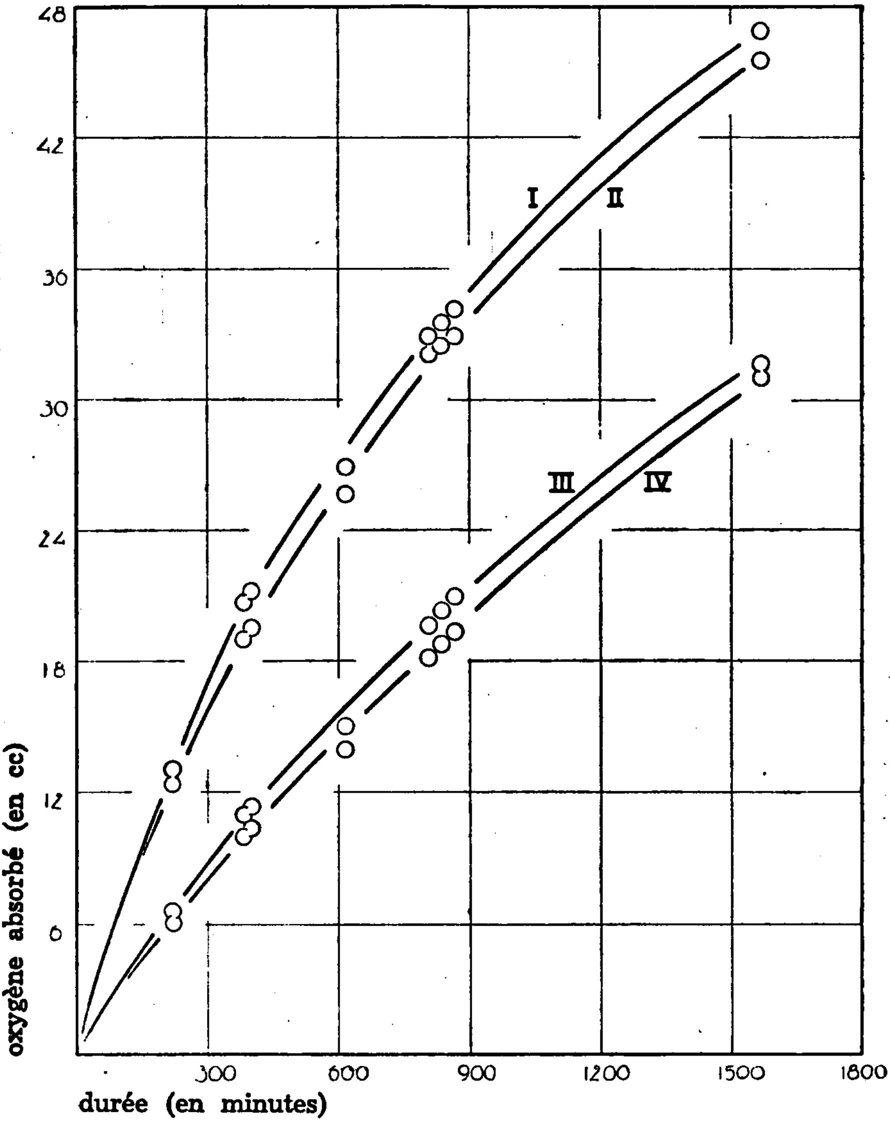
L'oxygène est utilisé rapidement dans les essais sur l'acide aminé. Lorsque nos flacons de 100 cc sont remplis d'air, il se peut que la tension de l'oxygène descende trop bas; nous renonçons toutefois à l'emploi de flacons d'une capacité plus grande, car ceux-ci réduiraient de beaucoup la précision des mesures.

Pour ce motif, nous avons continué à nous servir de flacons de 100 cc tout en remplaçant l'air par l'oxygène. Quelle est l'influence de ce changement sur le métabolisme basal? On pourrait se demander si les produits intermédiaires, dans l'oxygène à une tension cinq fois plus élevée, se décomposent d'une autre façon qu'à la tension de l'oxygène dans l'air?

Le graphique 11 répond à ces questions.

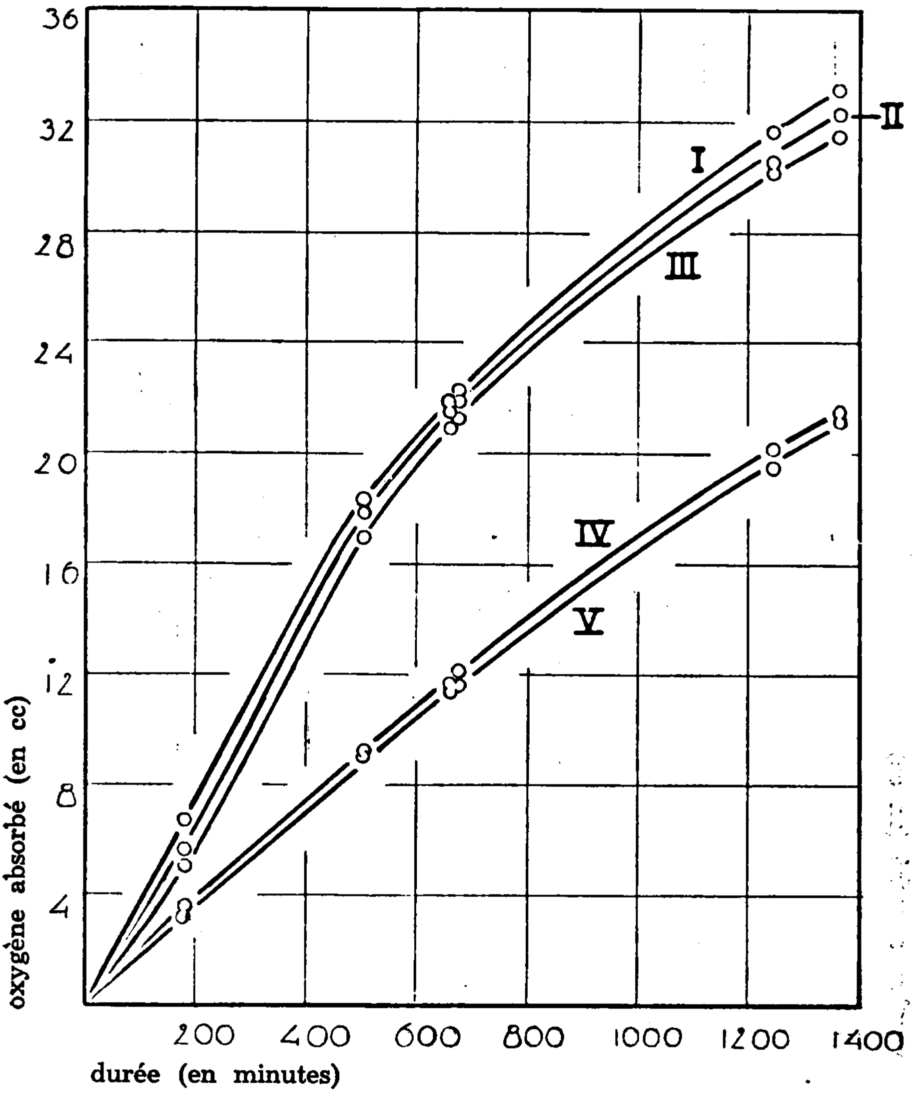
Du graphique 11 on conclut que le métabolisme basal est un peu plus intense dans l'oxygène pur que dans l'air. L'absorption d'oxygène augmente dans l'essai sur l'acide aminé et aussi dans l'essai-témoin. La présence de l'oxygène pur n'entraîne donc pas d'anomalie dans la consommation de l'acide aspartique.

Graphique 11.



Comparaison entre les absorptions d'oxygène dans des milieux à 20% (II et IV) et à 100% d'oxygène (I et III). Température 24,7°. Pression barométrique 765 mm. I et II: essais avec 46,69 mg. d'acide aspartique dans 10 cc; III et IV essais-témoins; pellicules de moisissure appauvries pendant 12 heures.

Graphique 12.



Consommation d'oxygène en présence de 39,43 mg. d'acide aspartique dans 10 cc (I, II et III) et en l'absence de cet acide (IV et V). Température 24,6°; pression barométrique 762 mm.; pellicules de moisissure appauvries pendant 12 heures.

a) *Consommation par respiration en milieu acide.*

En observant les précautions prescrites, on peut obtenir de très bons résultats; nous en donnons comme exemple le graphique 12 dans lequel toutes les courbes ont une allure extrêmement régulière.

Une allure aussi parfaitement parallèle des lignes correspondantes, telle que nous la présente le graphique 12, ne se vérifie pas toujours. Nous donnons dans le tableau 14 — exprimés en centimètres cubes d'oxygène absorbé — des exemples de changements de l'activité pendant les essais. MB_1 et MB_2 se rapportent au métabolisme basal des témoins.

TABLEAU 14.

Les essais sur l'acide aminé ont reçu 55,29 mg. d'acide aspartique dans 10 cc de solution tampon au phosphate; pH = 6,0 à 5,1; température 23,5°; pression barométrique 746 mm., pellicules appauvries pendant 12 heures.

	Durée minutes	I	II	III	MB_1	MB_2
Essais préliminaires	125'	1,39	1,45	1,56	1,70	1,57
Essais sur l'acide aminé	290'	6,17	6,61	7,03	4,11	3,57
	575'	18,05	18,47	18,61	8,44	8,21
	215'	4,15	4,00	3,96	2,66	2,72
	115'	1,81	1,87	1,96	1,20	1,34
	235'	3,72	3,64	3,53	2,80	3,41
Total:	1430'	33,90	34,59	35,09	19,21	192,85
					19,23	
Diminution par rapport au MB moyen des témoins		19,23	19,23	19,23		
Volume à 23,5° et 746 mm.		14,67	15,36	15,86		
Volume à 0° et 760 mm.		13,26	13,88	14,34 cc d'oxygène.		

En comparant les trois premières colonnes du tableau 14, on constate que l'intensité du métabolisme s'est modifiée au cours de la réaction. Après les 1080 premières minutes on a III > II > I et par contre à la fin de la réaction on a I > II > III.

Au cours de nos recherches nous avons généralement constaté qu'il faut faire attention surtout aux variations du pH pour éviter des variations d'intensité du métabolisme. Nous affirmons même que l'absorption d'oxygène subit l'influence de la première décimale du nombre représentant le pH.

Bien que dans cette expérience les pellicules manifestent des différences d'activité, nous croyons toutefois pouvoir nous en servir. Dans la suite de nos idées, rien n'empêche qu'il y ait des modifications du MB au cours des essais, pourvu que chaque

pellicule change au même degré.

Le point dont tout dépend, ce n'est pas que le MB se modifie *pendant l'alimentation* à l'acide aminé, mais le point capital, c'est la question de savoir s'il se modifie *à cause de l'alimentation.*

Dans notre premier exposé concernant le métabolisme basal (chapitre IV § 6), nous avons déjà traité les changements du MB ayant lieu au cours de nos expériences. Il y a été démontré que le métabolisme diminue à mesure que l'âge de la moisissure avance. Les modifications de ce genre ne contredisent pas notre thèse, pour le motif que le pH et l'âge influencent toujours d'une manière fondamentalement identique — et en général dans la même mesure — le métabolisme basal des cinq pellicules. Nous ajoutons même que la diminution du métabolisme basal en fonction du temps, est la condition des plus indispensables pour la justification de notre méthode; c'est qu'elle constitue le seul moyen de vérifier si le métabolisme basal se modifie à cause de l'acide aminé. Je m'explique!

Pour éclairer ce point, nous supposons un instant que nous travaillons avec des pellicules de moisissure dont l'absorption d'oxygène *ne dépend pas* des réserves nutritives intérieures de la cellule, de son âge etc. Dans un graphique représentant le métabolisme basal, exprimé par l'absorption d'oxygène, nous aurons alors une droite à une pente déterminée. Si l'on admet en outre que le métabolisme basal se modifie par l'alimentation à l'amino-acide, le métabolisme basal se présentera, la réaction finie, sous la forme d'une droite dont la pente égale celle de la droite originelle. A fortiori, la pente de cette droite restera inchangée lorsque le métabolisme basal *n'est pas* modifié par l'alimentation. L'allure de la courbe du graphique n'indiquera donc rien au sujet de l'influence de cette alimentation.

Si par contre le métabolisme basal dépend réellement de diverses circonstances intérieures ou extérieures de la cellule, la courbe ne sera jamais une droite dans le graphique, mais sa pente variera constamment. Si nous supposons que dans ce cas le métabolisme basal se modifie par l'acide aminé, l'état final de l'essai sur l'acide aminé sera différent de celui de l'essai-témoin. On peut donc s'attendre à un métabolisme final différent pour les deux groupes d'essais.

Mais si l'amino-acide *ne modifie pas* le métabolisme basal, la courbe du graphique présentera la même pente à la fin des deux groupes d'essais; c'est que la modification aura été la même dans les deux séries. Sur le graphique on pourra contrôler si les pentes finales des courbes sont les mêmes en déplaçant

parallèlement la dernière partie des lignes du graphique. Par conséquent, dans le cas traité dans cet alinéa, c'est le graphique qui tranche la question de savoir si le MB a été changé par suite de l'alimentation à l'acide aminé.

Or, quelle est la supposition qui se réalise dans nos essais? Il est clair que *dans nos essais* le métabolisme basal n'est pas indépendant de l'état de la cellule. Ceci doit être attribué à l'appauvrissement qui lui-aussi constitue une condition *indispensable* pour le but des présentes recherches. Nous avons donc affaire ici aux seules suppositions traitées dans l'alinéa précédent: c'est dire que les graphiques nous permettront de trancher la question qui nous occupe. Or, dans les graphiques tracés pour chacun des essais (voir par exemple le graphique 12), on constate que les pentes des courbes se rapportant à l'essai sur l'amino-acide et à l'essai-témoin sont sensiblement parallèles vers la fin. Par conséquent, le métabolisme basal de ces deux essais a été modifié au même degré. Il s'ensuit que, *pendant* l'alimentation à l'amino-acide, le métabolisme basal n'est pas modifié *par* l'alimentation. Toutes les conditions pour l'application de notre procédé opératoire sont ainsi réalisées. Passons aux résultats.

Dans les essais du graphique 12 et du tableau 14, nous avons trouvé comme résultats de nos calculs:

3,0
2,8
3,2
2,9
3,0
3,0

donc une moyenne de 3,0 atomes d'oxygène absorbés, par molécule d'acide aspartique. Nous faisons toutefois remarquer que, pour que ce résultat soit reproduisible, le pH ne doit pas dépasser les limites de 6,9 et 3,5.

Au dessous du pH = 3,0 on peut trouver ± 4 atomes d'oxygène absorbés par molécule d'acide aspartique. Nous ne nous prononçons pas sur la question de savoir s'il s'agit ici réellement d'une attaque plus prononcée de la chaîne carbonique plutôt que d'une oxydation plus intensive à la suite d'une déterioration des cellules. Un pH de 3,0 semble constituer sous plus d'un aspect, un point critique pour l'Aspergillus.

Itzerott (1936) par exemple a constaté qu'a un pH < 3,0 le nitrate pénètre dans les cellules sans y être assimilé.

Si le contrôle du métabolisme basal a démontré que les pellicules sont restées les mêmes, le calcul des atomes d'oxygène donne toujours des valeurs ne dépassant jamais les limites 2,8 et 3,2. Lorsque les pellicules n'étaient pas égales dans les essais préliminaires, elles sont encore capables de le devenir (voir le tableau 14). C'est pourquoi, dans la plupart des cas, on a mesuré l'absorption d'oxygène également pour ces pellicules. On peut pégliger les chiffres se rapportant à des essais dans lesquels le métabolisme basal est resté constamment différent, parce qu'ils ne satisfont pas aux conditions posées par les présentes recherches. On peut aussi additionner tous les chiffres non concordants et en calculer la moyenne. Comme il y aura toujours autant d'écarts *en plus* que d'écarts *en moins,* cette moyenne constitue un résultat auquel on peut se fier. Nous avons trouvé pour 23 déterminations:

3,1
3,2
2,8
3,3
2,8
3,3
3,0
2,8
2,7
2,7
3,0
2,6
3,3
2,7
3,2
3,0
3,0
2,6
2,9
3,0
3,1
3,2
3,0

Total 68,3 : 23 = 3,0 (moyenne).

Ces chiffres se rapportent à tous les pH compris entre 6,9 et 3,5. Il est donc clair que pour l'oxydation d'une molécule d'acide aspartique, trois atomes d'oxygène sont toujours utilisés, c'est

à dire la moitié exactement de la quantité théoriquement nécessaire. L'Aspergillus appauvri ne conduit donc pas l'oxydation jusqu'à la fin, mais s'arrête à mi-chemin. C'est un résultat remarquable. Au commencement de ce chapitre il a été dit que pour trouver les produits intermédiaires de la dissociation de l'amino-acide le premier pas doit encore être fait. Nous ne nous dissimulons pas que par nos essais nous n'accomplissons pas encore ce premier pas.

Toutefois, par suite de nos recherches, il est très clair comment ce problème pourrait être résolu expérimentalement Le fait que l'Aspergillus n'aboutit pas à l'anhydride carbonique et à l'eau, montre qu'il reste dans le liquide extérieur au moins un produit intermédiaire; probablement c'est le troisième produit intermédiaire. Dès lors, cette recherche est réalisable.

b) *En milieu alcalin.*

L'application de la méthode que nous avons suivie pour les essais en milieu acide, présente des difficultés dans le cas du milieu alcalin. Tout d'abord celle des modifications incessantes du pH. Nous constatons une formation d'acides; probablement elle se fait au dépens de la chaîne carbonique de l'amino-acide, mais un grand nombre d'acides provient certainement de la pellicule elle-même. C'est pourquoi on doit rectifier le pH beaucoup plus souvent au début qu'à la fin de la réaction; dans les circonstances où ont lieu ces essais, l'ammoniac n'est plus à même de relever le pH du liquide. Facilement se présente le cas qu'on doive ajouter 2 cc de soude caustique N/10. Par le graphique 7b, nous avons déjà représenté ces rétrogradations de l'alcalinité.

La modification de l'alcalinité exerce en outre une grande influence sur l'intensité de l'absorption de l'oxygène. La rectifi-

TABLEAU 15.

Absorption d'oxygène en présence de 11,2 mg. d'acide aspartique et en son absence. Température 23,5°; pression barométrique 767 mm.

	Durée en minut.	I	II	MB_1	MB_2
Essais préliminaires	195'	3,01	2,79	2,86	2,83
Essais	365'	6,66	7,06	6,76	6,35
	45'	1,17	0,90	0,90	0,85
	740'	10,46	10.54	9,52	9,79
	195'	2,25	2,22	2,30	2,40
	590'	6,03	6,49	6,06	6,00
Total:	1935'	26,57	27,21	25,54	25,39

cation du pH entraîne donc des passages brusques dans les courbes graphiques.

Cependant, suivant les idées développées au paragraphe précédent, la méthode n'en est pas moins applicable, à condition qu'on agisse de même pour tous les flacons d'essai.

Le tableau 15 représente le cours des essais.

L'absorption d'oxygène en milieu acide et celle en milieu alcalin diffèrent fondamentalement. En milieu alcalin il est impossible d'atteindre en un temps proche une absorption d'oxygène dans l'essai sur l'acide aminé, qui soit *égale* à celle de l'essai-témoin. Il importe peu qu'on parte d'une grande quantité ou d'une petite quantité d'amino-acide. Le tableau 15 le démontre.

Nous y sommes partis de 11,2 mg. et les essais ont duré 32 heures. Dans le premier essai sur l'acide aspartique, (colonne I du tableau) on trouve que l'absorption d'oxygène pendant les 590 dernières minutes est égale à celle des deux essais-témoins. C'est là le cas le moins fréquent. Dans le deuxième essai sur l'acide aspartique il y a encore, à la fin, une absorption plus considérable d'oxygène que dans les essais-témoins. Il en est presque toujours ainsi. Même après 48 heures, l'absorption n'est pas encore égale, comme nous l'avons constaté par d'autres essais.

Cette circonstance empêche de déterminer le nombre exact d'atomes d'oxygène consommés en milieu alcalin par la molécule d'acide aspartique. On ne peut déterminer que les limites entre lesquelles ce nombre d'atomes oscille. Nous avons trouvé pour 10 déterminations:

2,0
1,1
1,8
2,0
1,4
1,4
0,8
1,8
1,4
1,5

Le nombre moyen est 1,5.

Cela indique qu'un des premiers produits intermédiaires se décompose à une vitesse à peine mesurable. Pratiquement, il y a toujours un atome de consommé. Le premier degré d'oxydation n'est donc pas empêché par le milieu alcalin.

Quel est ce premier degré d'oxydation?

On comprendra que nous songeons ici à la désamination par oxydation.

Il importe de signaler que l'absorption de l'oxygène en milieu alcalin commence immédiatement, dès le début de l'essai, lorsque les pellicules sont appauvries. Cela ne peut pas ressortir du tableau 15 parce que les quantités d'acide aspartique (11,2 mg.) y sont trop faibles. Le tableau 16 y supplée.

TABLEAU 16.

	Durée en min.	essais sur l'acide aspartique			essais-témoins	
Essais préliminaires	260'	3,55	3,48	3,62	3.51	3,48
Essais	255'	4,11	4,13	4,11	3,55	3,58

L'augmentation de l'absorption d'oxygène est donc au commencement de l'essai de 0,56, de 0,65 et de 0,49 cc respectivement. Cette augmentation doit être considérée comme appréciable en comparaison de ce qui se passe pour les pellicules non-appauvries, pour lesquelles il n'est pas question d'une augmentation de l'absorption d'oxygène pendant de longues heures.

En résumé, nous concluons que l'Aspergillus appauvri commence directement la désamination par oxydation de la molécule d'acide aspartique et qu'il s'arrête devant la décomposition de la chaîne carbonique restante.

A la fin du chapitre précédent, nous avons soulevé la question de savoir quel est le point où le pH intervient pour entraver la décomposition des acides aminés. La réponse à cette question est celle-ci: la *désamination* n'est pas empêchée dans ce milieu; le pH influence la décomposition de la chaîne carbonique de l'acide aminé.

§ 3. *Consommation par respiration de l'acide oxalo-acétique.*

Pour la première expérience avec ce corps, nous avons choisi un pH initial de 6,6. Au premier flacon d'essai, nous avons ajouté 53,86 mg. d'acide aspartique; aux trois flacons suivants 50 mg. d'acide oxalo-acétique. Le cinquième flacon a servi de témoin (voir le tableau 17).

Les circonstances n'ont pas permis de pousser plus loin les déterminations de l'absorption de l'oxygène. Il est clair que la réaction n'est pas encore achevée; le nombre d'atomes d'oxygène employés par molécule d'acide ne peut donc pas être déduit de ce tableau.

TABLEAU 17.

°Température 22,5°; pression barométrique 774 mm.

	Durée en min.	Essai à l'acide aspartique I	Essais à l'acide oxalo-acétique II	III	IV	M.B. V.
Essais préliminaires	155	2,81	2,76	2,69	2,62	2,63
Essais	515'	16,60	18,12	18,18	18,66	11,87
	575'	15,49	11,71	11,68	12,08	9,35
	1290'	5,54	3,86	3,86	3,98	3,36
Total	1290'	37,63	33,70	33,72	34,37	24,58
M.B.		24,58	24,58	24,58	24,58	
Différence		13,02	9,12	9,14	10,14	

Le Tableau 17 démontre que l'Aspergillus peut décomposer par respiration l'acide oxalo-acétique; après les 500 premières minutes l'absorption d'oxygène est même plus grande dans les essais à cet acide que dans celui à l'acide aspartique. Si l'acide oxalo-acétique était le premier produit intermédiaire, la décomposition par respiration de ce produit ne serait donc pas le facteur qui limite la décomposition.

Après 1090 minutes le flacon contenant l'acide aspartique absorbe une quantité plus grande d'oxygène que les autres flacons. Si l'acide oxalo-acétique était le premier produit intermédiaire, les quantités d'oxygène absorbées, qui sont employées pour la décomposition de l'acide aspartique et de l'acide oxalo-acétique devraient être dans le rapport 3 : 2. Notre expérience nous faisait supposer que ce rapport serait atteint, mais deux nouvelles expériences n'ont pas confirmé ce fait. Le tableau 18 est donné à titre d'exemple.

Si nous traduisons ces mesures en atomes d'oxygène par molécule d'acide oxalo-acétique, nous trouvons 3,6 et 3,5 atomes; une nouvelle expérience nous a donné: 3,0; 2,8; 2,4 et 3,0, donc en moyenne 3,1 atomes. Les écarts par rapport à la moyenne sont très grands: de 2,4 à 3,6 atomes. Nous ne savons pas comment les expliquer. Une complication doit avoir surgi dans ces essais à l'acide oxalo-acétique. Il faut peut-être en rechercher le motif dans le fait que la concentration est beaucoup plus grande que dans le cas où l'acide oxalo-acétique serait engendré comme premier produit intermédiaire après la désamination. Il nous échappe toutefois comment il peut en résulter une augmen-

TABLEAU 18.

Acide aspartique, 53,86 mg.; acide oxalo-acétique 50 mg.; température 22,3°; pression barométrique, 765,5 mm.; pH initial 6,6; pH final = 6,2.

	Durée en minutes	I Ac. aspartique	II Ac. axalo-acétique	III Acide oxalo-acétique	IV M.B.
	320'	9,67	8,67	8,61	5,60
	620'	13,45	16,13	15,83	6,79
	310'	6,29	5,64	5,59	3,70
	270'	4,31	4,38	4,40	3,22
	115'	1,40	1,62	1,71	11,44
Total	1635'	35,12	36,44	36,14	20,75
M.B.		20,75	20,75	20,75	
Différence		14,36	15,69	15,39	
à 0° et 760 mm		13,69 cc	14,95 cc	14,66 cc	

tation de l'absorption d'oxygène. Notre mode opératoire ne nous permet pas de travailler à des concentrations moins fortes. Nous ne pensons pas pouvoir déduire de conclusion sûre de l'ensemble de nos essais à l'acide oxalo-acétique.

§ 4. *Conclusions.*

Le chapitre présent ajoute une nouvelle série de préférences à la préférence pour le sucre que nous avons traitée plus haut, et nous apportons une précision à l'ensemble de toutes ces préférences.

Il a été expliqué que le mot „préférence" ne veut pas dire autre chose que le sucre est pour l'Aspergillus une meilleure source d'énergie que l'asparagine. Le bien-fondé de ce principe a été confirmé par les expériences décrites au cours du chapitre IV. Précisons maintenant la mesure dans laquelle l'asparagine elle-même est utilisée comme source d'énergie.

Nous trouvons que l'Aspergillus appauvri utilise en milieu acide l'énergie libérée au cours de l'absorption de trois atomes d'oxygène, tandisqu'en milieu alcalin l'Aspergillus ne parvient à utiliser d'une façon appréciable que l'énergie liberée par le seul processus de la désamination par oxydation. Si le sucre est introduit dans le milieu alcalin, l'Aspergillus n'est plus à même d'utiliser l'énergie conservée dans la structure aminodicarboxylique de l'asparagine; dans ces circonstances, seul le radical amide est détaché, comme il a été démontré par les expériences de SCHMALFUSZ et MOTHES.

Par la variation des conditions physiologiques du milieu, on parvient donc à mettre au jour quatre préférences de l'Aspergillus qu'on peut classer selon une échelle d'intensité:

1. sucre
2. radical amide ⎫
3. radical amine ⎬ de l'asparagine
4. chaîne carbonique ⎭

Les données recueillies au sujet des enzymes jouant une rôle dans le métabolisme du sucre et de l'asparagine, cadrent parfaitement avec la concurrence qui est à la base de ces préférences. En effet, étant donné que la désamination représente une hydrolyse, le détachement du radical amide par l'asparaginase est le seul processus qui soit effectué sans activation d'oxygène. Cette activation d'oxygène intervient tant dans la décomposition du sucre que dans la transformation du radical amine; ceci explique la concurrence. Par contre, les autres composants des deux systèmes fermentatifs diffèrent de beaucoup et le milieu alcalin est de nature à ne pas permettre leur activité simultanée.

De même, la désaminase fait partie d'un système fermentatif qui diffère de celui des déshydrogénases. Krebs a réussi une séparation des deux systèmes in vitro en empoisonnant les déshydrogénases par de l'anhydride arsénieux. Selon nos expériences, il se trouve que cette même séparation se réalise en milieu alcalin en l'absence du sucre. En variant les conditions physiologiques du milieu, on peut donc faire ressortir dans le vivant l'action différente de l'un ou de l'autre système fermentatif.

RESUME

Cette étude a été provoquée à la suite d'une publication de Schmalfusz et Mothes (1930) dans laquelle les auteurs aboutissaient à la conclusion qu'en milieu alcalin l'Aspergillus niger n'est pas capable de désaminer l'asparagine.

Notre dispositif opératoire s'écarte en plusieurs points de celui de ces auteurs. En premier lieu, la culture des pellicules et l'examen de la décomposition des animo-acides par ces pellicules, ont été séparés. Pour la culture, nous avons employé un substrat sucré, et nous avons étudié d'abord la désamination en l'absence du sucre.

Ensuite, nous avons toujours appauvri les pellicules avant les essais; en d'autres termes, nous avons provoqué la consommation

des réserves nutritives mobiles. Ainsi le mycélium a été débarrassé des matières qui auraient pu compliquer la désamination. Nous avons démontré que l'activité ne diminue pas par l'appauvrissement des pellicules.

L'Aspergillus appauvri peut désaminer et désamider en peu de temps des quantités d'asparagine facilement mesurables, ce qui permet de mesurer la vitesse de réaction initiale dans un essai de très courte durée (4 heures). Par la méthode consistant dans la mesure des vitesses initiales, nous avons examiné d'abord l'influence des divers facteurs (concentration du substrat, appauvrissement, âge); nous avons combiné ensuite les données ainsi obtenues pour aboutir à une représentation générale du métabolisme.

L'introduction de la notion du „métabolisme basal" a une importance capitale dans l'étude de notre problème. Par métabolisme basal nous entendons un minimum d'échange de matières nécessaire pour continuer la vie de l'organisme. S'il se réalise, il y a équilibre ou presqu' équilibre entre dissociation et synthèse. Le métabolisme basal continue à s'exercer pendant l'alimentation et peut être isolé sans mélange de réactions superposées au moyen de l'appauvrissement.

Nous avons constaté que l'Aspergillus appauvri est capable de désaminer en milieu alcalin. L'Aspergillus non-appauvri ne peut passer à la désamination qu'après onze heures ou davantage. Nous avons démontré que, pendant ce temps, la moisissure subit un appauvrissement. Quand celui-ci est achevé, la désamination commence. Par conséquent lorsque l'Aspergillus ne passe pas à la désamination, cela ne signifie pas qu'il en est incapable, mais que la désamination est différée.

Pour expliquer ce délai, nous avons formulé l'hypothèse que les *sucres* soient les substances qui empêchent la désamination dans le mycélium de pellicules non-appauvries. L'Aspergillus semble décomposer *de préférence* les sucres, et il ne commence à désaminer que lorsque la teneur en sucre a fortement diminué dans les pellicules.

Dans le chapitre IV, nous avons soumis cette hypothèse à plusieurs expériences, en examinant l'influence des diverses teneurs en sucre de la solution extérieure. Nous avons constaté à ce sujet que les teneurs en sucre tant fortes que faibles sont à même d'entraver la désamination. L'inhibition de la désamination est déjà assez prononcée en milieu acide et à un pH élevé il est *complet*. Le défaut d'oxygène peut aussi arrêter complètement la désamination.

Dans le chapitre V quatre autres moisissures ont été examinées sur leur comportement par rapport au sucre, à différents pH. Le Mucor racemosus semble aussi réagir sous ces différents facteurs, mais en sens inverse de celui de l'Aspergillus. Ceci nous conduit à l'idée que le pH n'exerce pas d'influence directe sur la désamination; l'inhibition serait provoquée par une décomposition ralentie de la chaîne carbonique qui reste après la désamination.

Au chapitre VI nous avons soumis cette hypothèse à l'épreuve de l'expérience. Nous avons constaté que l'Aspergillus appauvri ne peut pas conduire l'oxydation à son terme théorique, qui exige six atomes d'oxygène par molécule d'acide aspartique; en milieu acide, l'oxydation n'arrive qu' à mi-chemin (trois atomes d'oxygène). En milieu alcalin, nous n'avons pu constater avec certitude qu'un seul degré d'oxydation. La décomposition par respiration de la chaîne carbonique a lieu à une vitesse qui n'est qu' à peine mesurable.

A un pH élevé, la décomposition de l'amino-acide par l'Aspergillus manifeste donc plusieurs phases. En l'absence des sucres, la désamination est possible mais la décomposition de la chaîne carbonique ne l'est presque pas. En présence des sucres, la désamidation est possible, mais la désamination ne l'est plus.

Dans cette étude les résultats que H. A. Krebs a obtenus in vitro par empoisonnement des tissus, ont été reproduits dans le mycélium vivant en variant les conditions physiologiques du milieu.

Les présentes recherches ont été accomplies au „Plantenphysiologisch Laboratorium" de l'Université d'Amsterdam. Je ne veux pas manquer d'exprimer mes sentiments de profonde reconnaissance à l'égard de M. le Professeur Th. Weevers qui a créé la possibilité de mes travaux et qui en a vivement stimulé l'accomplissement.

Je dois aussi beaucoup à l'admirable dévouement et à la science remarquable de M. le Dr. A. W. H. van Herk qui m'a dirigé dans l'exécution pratique du travail. Je veux lui exprimer également mes sentiments de la plus sincère reconnaissance.

BIBLIOGRAPHIE

D. Bach (1928). Les conditions d'action de l'asparaginase de l'Aspergillus niger. C. r. de l'Ac. d. Sc. 187, 955.

I. Banga, L. Schneider und A. Szent Györgyi (1931). Einfluss der arseniger Säure auf die Gewebsatmung. Bioch. Zft. 240, 464.

T. A. Bennet-Clark and C. J. La-Touche (1935). The utilisation of organic acids by Aspergillus niger. The New Phytol. 34, 211.
F. Bernheim and M. Bernheim (1934). The oxidation of proline and alanine by certain tissues. Journ. Biol. Chem. 106, 79.
—— (1935). The purification of the enzymes which oxidize certain amino-acids. Journ. Biol. Chem. 109, 131.
A. Blanchetière (1917). Action du bacille fluorescent liquéfiant de Flügge sur l'asparagine en milieu chimiquement défini. Ann. de l'Inst. Pasteur 31, 291.
E. Bünning (1936). Ueber die Farbstoff- und Nitrataufnahme bei Aspergillus niger. Flora 31, 87.
W. Butkewitsch (1903). Umwandlung der Eiweiszstoffe durch die niederen Pilze. Jahrb. wiss. Bot. 38, 147.
J. Effront (1908). Action de la levure de bière sur les acides amidés. C. r. de l'Ac. d. Sc. 146, 779.
H. von Euler und K. Myrbäck (1927). Chemie der Enzyme (München).
O. Fürth und M. Friedmann (1910). Über die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente. Bioch. Zft. 26, 435.
O. Fürth und Fr. Lieben (1922). Über Milchsäure-zerstörung durch Hefe und Blutzellen. Bioch. Zft. 128, 144.
W. F. Geddes and A. Hunter (1928). Observations upon the enzyme asparaginase. Journ. Biol. Chem. 77, 199.
W. Grassmann und O. Mayr (1933). Zur Kenntnis der Hefe-asparaginase. Zft. Physiol. Chem. 214, 185.
C. E. Grover and A. C. Chibnall (1927). The enzymic deamidation of asparagine in the higher plants. Bioch. Journ. 21, 856.
J. B. S. Haldane und K. G. Stern (1932). Allgemeine Chemie der Enzyme (Dresden).
H. Heigener (1935). Verwertung von Aminosäuren. Centrbl. f. Bakt. II, 93, 81.
W. F. van Hell (1931). Onderzoekingen over ziekten van lelies. Diss. Utrecht.
D. Itzerott (1936). Über die Bedingungen der Stickstoff-aufnahme, vor allem der Nitrataufnahme, bei Aspergillus. Flora 31, 60.
N. N. Iwanoff und A. N. Awetissowa (1931). Über die fermentative Umwandlung des Guanidins in Harnstoff. Bioch. Zft. 231, 88.
K. Jacobsohn, J. Tapahindas et F. B. Pereira (1935). Sur la synthèse de l'acide aspartique dans le foie à partir de l'acide fumarique. C. r. de la Soc. Biol. 120, 33.
A. Janke (1930). Der Aminosäure-Abbau durch Mikroben Arch. f. Mikrob. 1, 304.
A. Janke und Tayenthal (1937). Probleme des Stickstoffkreislaufes. Bioch. Zft. 289, 76.
A. J. Kluyver und L. H. C. Perquin (1933). Zur Methodik der Schimmelstoffwechsel-untersuchung. Bioch. Zft. 266, 68.
F. Knoop und H. Oesterlin (1925). Über die natürliche Synthese der Aminosäuren und ihre experimentelle Reproduktion. Zft. Physiol. Chem. 148, 294.
S. Kostytchew und E. Tswetkowa (1920). Über die Verarbeitung der Nitrate in organische Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze. Zft. physiol. Chem. 111, 171.
H. A. Krebs (1933 a). Untersuchungen über der Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper I. Zft. physiol. Chem. 271, 191.
—— (1933 b). Untersuchungen über der Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper II. Zft. physiol. Chem. 218, 157.
—— (1935 a). Deamination of amino-acids. Bioch. Journ. 29, 1620.

—— (1935 b). The synthesis of glutamine. Bioch. Journ. 29, 1951.
—— and W. A. Johnson (1937 a). Metabolism of ketonic acids in animal tissues. Bioch. Journ. 31, 645.
—— (1937 b). Dismutation of pyruvic acid in Gonococcus and Staphylococcus. Bioch. Journ. 31, 661.
S. Lang (1904). Über Desamidierung im Tierkörper. Hofm. Beiträge z. chem. Physiol. und Path. 5, 312.
O. Neubauer (1909). Über den Abbau der Aminosäuren im gesunden und kranken Organismus. Deutsch. Arch. f. klin. Med. 95, 211.
H. Pringsheim (1908). Über Pilzdesamidase. Bioch. Zft. 12, 15.
K. Schmalfusz und K. Mothes (1930). Über die fermentative Desamidierung durch Aspergillus niger. Bioch. Zft. 221, 134.
O. von Schoenebeck (1930). Diss. München.
K. Shibata (1904). Über das Vorkommen von Amide spaltenden Enzymen bei Pilzen. Hofm. Beiträge z. chem. Physiol. u. Path. 5, 384.
A. Szent Györgyi (1935). Über die Bedeutung der Fumarsäure für die tierische Gewebsatmung. Zft. physiol. Chem. 236, 1.
T. Tamyia und S. Morita (1929, 1930). Bibliographie von Aspergillus. Bot. Mag. Tokyo, 43 und 44.
R. van der Veen (1930). Onderzoekingen over Tracheomycosen. diss. Utrecht.
A. I. Virtanen und J. Tarnanen (1932). Die enzymatische Spaltung und Synthese der Asparaginsäure. Bioch. Zft. 250, 193.
C. Wehlburg (1932). Onderzoekingen over erwtenanthracnosen. diss. Utrecht.
H. Weil-Malherbe and H. A. Krebs (1935). The conversion of proline into glutamic acid in kidney. Bioch. Journ. 29, 2077.
H. Wieland und O. B. Claren (1932). Über das dehydrierende Fermentsystem der Hefe. Liebig's Ann. d. Chem. 492, 183.
H. Wieland und Fr. Wille (1935). Weitere über die Dehydrierung von Alkohol durch Hefe. Liebig's Ann. d. Chem. 515, 260.
B. Woolf (1929). Some enzymes in B. coli communis which act on fumaric acid. Bioch. Journ. 23, 472.